

東京大学大学院医学系研究科・教授

清 水 孝 雄

「脂質メディエーターのdual receptor系と神経機能」

研究期間：平成 10 年12 月 1 日～平成 15 年11 月 30 日

1. 研究実施の概要

脳は脂質の宝庫と言われており、実際に多数の脂質メディエーターが産生され、分解されている。しかし、その神経機能や病態との関連については、十分明らかとなっていない。特に脂質メディエーターが持つ脂質としての物理化学的性質をどのように活かしているかは、不明の点が多い。本研究では、脳における脂質メディエーターの産生、分解、輸送、また、受容体と細胞内シグナル伝達を明らかにし、その生理作用と病態における役割を明らかにすることを目的として計画された。

実際の研究としては、分子レベル、細胞レベル、組織レベル、さらに個体レベルと各階層に分け、また、この研究を行うために、生化学・分子生物学（東大、群馬大学）、電気生理学（新潟大学、高知大学）、形態学（愛知心身障害者コロニー）、創薬（明治製菓）によるチームを編成した。各階層における具体的な研究内容は次の通りである。

(1) 分子レベルの研究

脂質メディエーターの産生、分解に関わる新しい酵素分子、脂質メディエーターの受容体を単離する。それぞれの分子の基本的性質を明らかにする。

(2) 細胞レベルの研究

脂質メディエーター産生系、分解系酵素の細胞内局在（炎症細胞および神経細胞）と刺激による細胞内での変化を明らかにする。また、新規に発見した受容体を高発現した細胞を用意し、細胞内セカンドメッセンジャーや転写調節、また細胞運動などを明らかにする。また、酵素阻害剤や受容体拮抗薬のスクリーニング系を構築する。

(3) 組織レベルの研究

新規に単離した酵素、受容体、あるいは既存の分子でその脳での局在が明らかでない分子に関しては、免疫組織化学、in situ hybridizationなどを用いて、脳内分布を明らかにする。また、各種遺伝子改変マウスの脳組織を病理学的に解析する。

(4) 個体レベルの研究

新規分子の過剰発現、あるいは欠損マウスを作製し、個体レベルでの機能を解析する。具体的には脳形態、生理学的特性、行動解析、また、種々のストレスに対する応答を明らかにする。

以上の計画に沿って、研究が5年間継続された。その主要な成果は以下の通りである。便宜上、1) 酵素、2) 受容体にわけて概説する。

(1) 分子レベルの研究

- 1) 脂質メディエーター産生酵素の研究では、細胞質型ホスホリパーゼA2 α (後述)と同じ仲間細胞質に存在し、カルシウムイオンで活性化される新規のホスホリパーゼA2 (cPLA2 β 1, β 2, β 3) を新たに発見した。これらの酵素は脳、心、肺、生殖器系などに存在している。また、カイニン酸刺激で海馬歯状回に特異的に発現する新規ホスホリパーゼA2 α (kainite-inducible dentate specific, KIDS cPLA2) を発見した。Kids cPLA2はcPLA2 α の断片であるが、カイニン酸刺激、虚血再灌流、電気刺激などで誘導され、また、発現も歯状回に局在しているなど、興味ある分子と言えよう。さらに、cPLA2 γ は小胞体に存在しているが、酸化ストレスにより活性化され、膜のリモデリングに関わることを示した。
- 2) 脂質メディエーターの受容体に関しては、この5年間でロイコトリエンB4の二つの受容体 (BLT1, BLT2) また、ロイコトリエンC, Dの二つの受容体 (CysLT1, CysLT2) を発見し、また、種々のオーファン受容体のリガンド探索の過程で、新しいリゾホスファチジン酸受容体 (p2y9, Lpa4と命名) を発見した。また、オーファン受容体の脂質リガンド探索系を構築し、天然脂質の中から新たな生理活性脂質を探している。また、PAF受容体に関しても、患者のSNP解析、さらにギンコライド系拮抗薬の開発などを共同研究で行った。各種酵素、および受容体拮抗薬のスクリーニング系を構築し、民間研究所との共同研究を進めている。Dual receptor仮説は我々のグループで証明することは出来なかったが、国内外のいくつかのグループより、これを支持する研究結果が報告された (プロスタグランディン、胆汁酸、脂肪酸、

リゾホスファチジン酸、酸化リン脂質など)。

(2) 細胞レベルの研究

- 1) cPLA2 α に関してはカルシウム刺激で末梢細胞（マクロファージ、好中球系の細胞）では核膜、ゴルジ体などのリン脂質膜に移行し、また、ニューロンでは核膜周辺と同時に樹状突起の棘構造と思われる場所に移行することが明らかとなった。5-リポキシゲナーゼは核内外を行き来し、カルシウム刺激で核膜周辺に動くこと、ロイコトリエンA4水解酵素はチロシンキナーゼ活性により、その局在を変化させることが明らかとなった。
- 2) 脂質メディエーター受容体を発現した細胞での、リガンド刺激に対応する細胞内セカンドメッセンジャーの動き、また、細胞運動や分泌などへの関与を明らかにした。また、培養ミクログリアの遊走、サイトカイン放出などの作用を示すことが明らかとなった。

(3) 組織レベルの研究

- 1) 各種の酵素の局在について、脳切片を用いて解析した。この結果、細胞質型ホスホリパーゼA2は小脳プルキニエ細胞に多く、全てのニューロンに幅広く発現していた。興味深いことに、ロイコトリエンC4合成酵素は視床下部の一部と脳下垂体後葉に局限して発現し、バゾプレッシン含有ニューロンに局在することが明らかとなった。
- 2) 多くの受容体はニューロン、ミクログリアまた、一部はアストロサイトに発現していることが明らかとなった。部位的な局在に関しては、特徴が認められなかった。

(4) 個体レベルの研究

- 1) cPLA2 α 欠損マウスの解析が進んだ。生理的には神経可塑性や水迷路学習での障害、また、生殖系や内分泌系での異常が明らかとなった。また、病態モデルでは本酵素分子あるいは酵素産物が、虚血再灌流障害（脳梗塞モデル）、アレルギー性脳脊髄膜炎（多発性硬化症モデル）、炎症性骨破壊、関節リウマチ、実験的肺損傷、

ブレオマイシン誘発性線維症などの発症に深く関与していることを明らかにした。

その他の酵素の欠損マウスの作製は準備が進められている。

- 2) PAF受容体欠損マウスの解析から、PAFがシナプス伝達の促進、神経初期発生に関与すること、また、HIV誘発の痴呆への影響が示された。BLT1, BLT2, CusLT2, p2y9の受容体に関しては、一部は既にマウスが作製されており、また、その他のものもB6バックグラウンドのES細胞での相同組み換えが修了している。詳細な脳機能の解析は今後の課題である。

以上の研究成果の一部は65編の英文論文（5年間）として発表され、また、数多くの国内外口頭発表（うち、招待講演は24）、3つの国際学会の主催（2003キーストンシンポジウム、2001国際PAF学会、2002国際プロスタグランディン学会）、さらに2件の特許出願の形でまとめた。さらに、終了時点で4つの論文が投稿準備中であり、3つが審査中である。

2. 研究構想

脂質メディエーターは炎症や免疫反応に深く関わっているが、その神経機能に関しては未知の点が多かった。一般に神経機能を明らかにするには、分子生物学、生化学を土台に、電気生理学、形態学、細胞生物学、さらに発生工学などの協力が必要なものと言うまでもない。さらに、基礎研究の成果が広く社会に還元されるためには、最終的に創薬を通して、健康の維持、疾病の治療に向かうべきである。この様な構想から、チーム編成を行った。しかし、研究の主体はあくまで東京大学の清水グループ（生化学・分子生物学）であり、実際、成果の大部分もこの研究室で行われたものである。この様な基本的なチーム構成を元に、分子、細胞、組織、個体と異なる階層で行える研究を綿密に計画し、進めてきた。その結果、脂質メディエーターが神経可塑性、神経初期発生や神経内分泌に関わると同時に、脳虚血後梗塞、多発性硬化症などをはじめとする種々の病態に関与することを明らかにしてきた。この結果は、今後脂質メディエーターの合成酵素阻害薬や受容体の拮抗薬を開発する上で、貴重な基礎データを出したことになる。

研究開始時には、脂質メディエーターの持つ特性として「dual receptor仮説」（一つのリガンドが細胞膜受容体と核内受容体の双方と結合しうる）を掲げた。これは研究を開始する以前の予備データから、多くの脂質メディエーターが細胞膜ではなく、核膜周囲で合成されること、脂質が膜を自由に通過しうるという二つの事実を前提にしていた。しかし、数多くの実験にも拘わらず、ステロイド膜受容体を見つけることは出来ず、また、逆にプロスタグランジンなどの核内受容体を見つけることは出来なかった。また、脂質メディエーター産生酵素が、極性を持たない炎症細胞では核膜やゴルジ体などで合成されるのに対して、ニューロンでは核膜だけでなく、樹状突起の棘構造と思われる場所で産生されるという我々自身のデータとも符合した。これが当初の計画の大きな誤算であったが、同時に全く予想しない新しい分子を次々に見つけるなど、予想以上の展開もあった（cPLA2 β ファミリー、KIDS cPLA2, LPAの新しい受容体など）。中間評価を受け、必ずしもdual receptorにこだわらず進めるようにと

の指摘を受け、その後、新規分子の解析に重点を移していった。その後は、プロジェクトごとに凹凸のあるものの、当初に予定した計画をほぼ達成し、今後に大きな発展の可能性を示したように思われる。分子レベル、細胞レベル、組織レベル、及び個体レベルの各成果は1に示してあるので、ここでは、研究を通して明らかとなった今後の課題を述べたい。(1) 海馬CA1領域でcPLA2 α 欠損マウスが長期抑圧の消失を示した。この分子機構及び生理的意義（行動解析など）。(2) システイニルロイコトリエン合成酵素が視床下部、脳下垂体後葉に局限して発現していた。受容体もこれらの部位に多いことを考えると、下垂体後葉機能との関連が期待される。これは現在進めている遺伝子改変マウスの解析から明らかとなろう。(3) KIDS cPLA2は刺激に応じて海馬歯状回に局限して発現し、その発現は神経前駆細胞に多いことが推察された。これは、神経細胞の生死に脂質メディエーターが関与している可能性を示し、また、歯状回の意義を明らかにする大きな研究に発展する可能性がある。(4) cPLA2のタイプの一つ(γ)はカルシウムでは活性化されないが、酸化ストレスで活性化されることがわかった。さらに、網羅的なリン脂質の脂肪酸組成を解析すると酵素が脂質二重膜のリモデリングに関わっていることが明らかとなった。こうした発見を契機に、ホスホリパーゼA2は単に脂質メディエーターを産生するだけでなく、生体膜の脂質組成を変化させ、種々のタンパクやアミンなどに対する応答を変化させる可能性があるとの認識に至った。これは、その後、寄付講座「メタボローム講座」(島津製作所、小野薬品工業共同)の設立へと結びついて行った。この寄付講座は日本で初の脂質を対象としたメタボローム解析講座の役割を果たすことになっている。

3. 研究成果

3. 1 分子生物学グループ（東京大学大学院医学系研究科）

(1) 研究内容及び成果

本研究グループが90%以上の研究を行った。自らのグループで各種の分子単離、解析を行うと同時に、他のグループへ遺伝子改変マウスを送り、その解析を依頼した。また、各種抗体なども作製し、免疫組織化学的方法（形態学グループ）の研究に協力した。具体的な研究成果は以下の通りである。

1. 脂質メディエーター産生酵素に関する研究

生理活性脂質（脂質メディエーター）はアミンやペプチド性のリガンドと異なり、顆粒に貯蔵されていない。また、サイトカイン類の様に転写レベルで直接調節されているわけでもない。通常は生体膜に不活性な前駆体として存在し、刺激に応じて産生され、作用を終えた後速やかに（あるものは数十秒で）消失する。一部は再度膜のリン脂質へ取り込まれ、再利用される。この様な性質のため、生合成、分解に関わる酵素の研究を重視している。この5年間の成果は次の様にまとめられる。

(1) 細胞質型ホスホリパーゼA2 α の生理的、病理的意義の解明

細胞質型ホスホリパーゼA2 α はアラキドン酸含有リン脂質を基質とするため、エイコサノイドや血小板活性化因子などの産生に最も重要である。本プログラムの開始前に、欠損マウスを作製した。従って、この5年間でマウスの大量生産、純系化及び解析を行ってきた。その結果、cPLA2 α 欠損マウスは海馬の長期増強は正常に起こるが、長期抑圧が完全に消失していることを明らかとした。長期抑圧の消失（減弱）はアラキドン酸投与により回復することより、アラキドン酸あるいはその代謝物が可塑性に関与している可能性が示された。実際、2003年に米国のコロンビア大学のグループがアラキドン酸リポキシゲナーゼの欠損で同様な長期抑圧の消失を報告しており、我々のデータと合致した。cPLA2 α の作用機構はまだ明らかとなっていないが、免疫組織で酵素は樹状突起の棘に存在しており、また、GFP融合タンパクを培養ニューロ

ンに発現させた実験でも、グルタミン酸刺激に応じて酵素タンパクの棘への局在変化が観察されることから、シナプス後膜で作られたアラキドン酸代謝物が、AMPA受容体などをアロステリックに調節するか、あるいはプレシナプスで伝達物質の放出を阻害するかのいずれかの可能性が考えられる。また、海馬CA1の長期抑圧の生理的意義はまだ十分明らかになっておらず、現在進めている行動解析が非常に重要と考えられる。また、神経以外では着床障害、受精卵の成熟障害、さらに分娩の消失など重篤な生殖系の異常が発見され、また、小腸に潰瘍形成が起こった。

他方、cPLA2 α 欠損マウスは脳虚血再灌流障害、多発性硬化症モデル（実験性脳脊髄アレルギー性炎症）、急性肺損傷、気管支喘息、コラーゲン誘発性関節炎、動脈硬化、炎症性骨破壊など、いずれの病態でもその症状、病理組織、致死率などの明らかな軽減が認められた。これらのマウスの現象は、cPLA2 α 阻害薬でも認められたため、マウスの遺伝的違いではなく、酵素の活性化に伴う脂質メディエーター産生減少がその原因と考えられた。

(2) KIDS cPLA2 α の発見と解析

カイニン酸を投与すると痙攣発作がおこり（側頭葉てんかん）、その後神経細胞の脱落などが認められることは知られていた。また、これらの痙攣発作時に大量のアラキドン酸やその代謝物が産生され脳脊髄液に放出されることが知られていた。そこで、カイニン酸刺激により、cPLA2 α の転写物がどのように変化するかをノザンブロットで解析したところ、cPLA2 α そのものは変化が少ないが、より短い分子の相同物が発現することがわかり、これをクローニングしたところ、短縮型ホスホリパーゼA2であった。途中のメチオニンを開始コドンと認識して、海馬歯状回に特異的に発現するこの分子はkainate-inducible dentate specific cPLA2 α (KIDS cPLA2) と命名された（図1）。本分子は歯状回顆粒細胞に多く存在する神経前駆細胞に発現しており、神経の発生や再生との関連に注目した研究を始めている。興味深いことに、KIDS cPLA2はcPLA2 α 欠損マウスでも同様に発現するため、別のプロモーターを用い、刺激に応じて歯状回に特異的に発現させる仕組みがあると考えられる。酵素は極めて不安定で、精

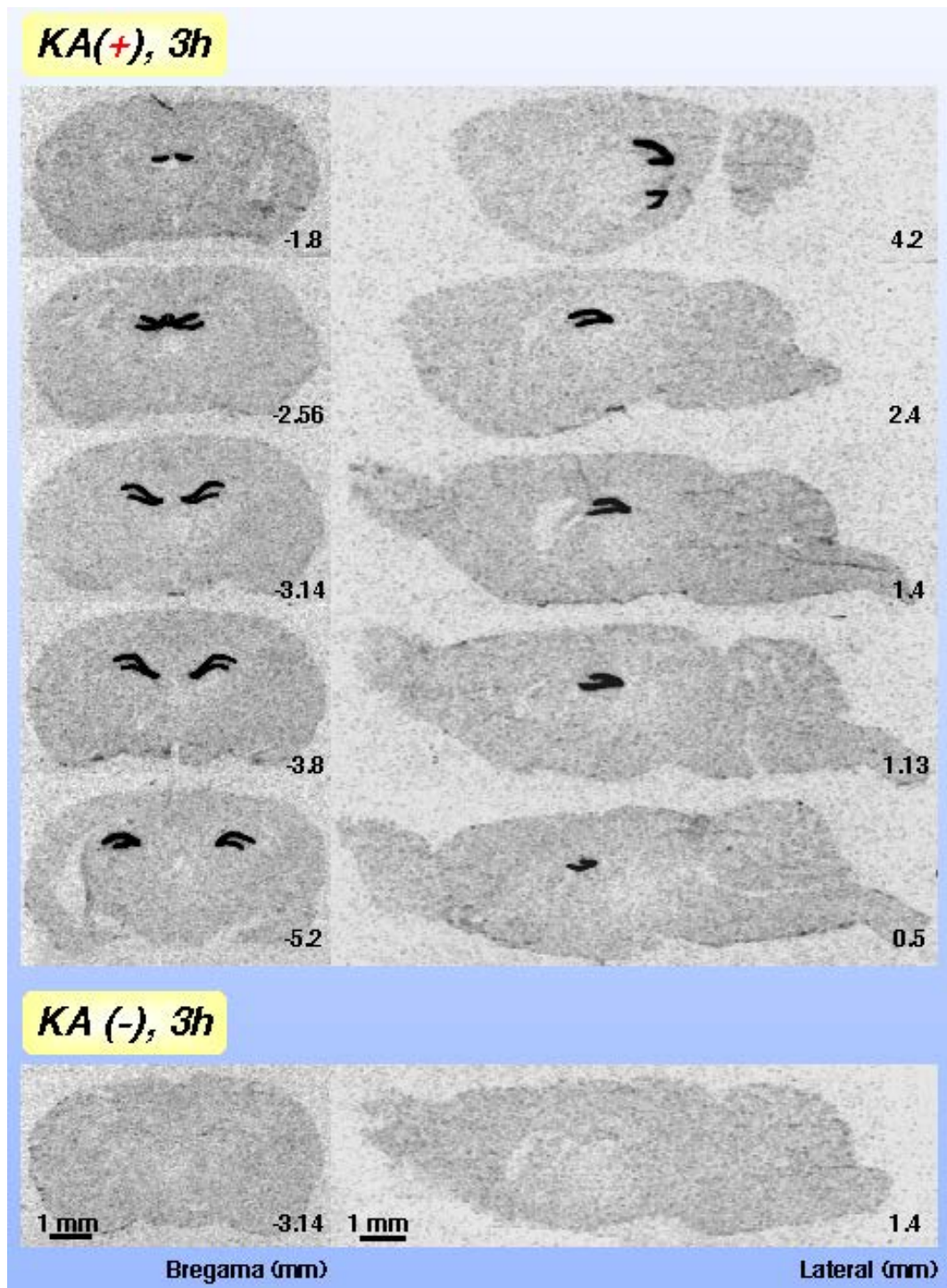


図1 カイニン酸処理により、歯状回に特異的に発現するホスホリパーゼA2短縮形ISH (in situ hybridization) で、その特異的発現が認められる。

製が困難であるが、活性にはカルシウムイオンを必要とせず、別の活性化機構があると考えられる。

(3) cPLA₂βファミリーの単離と解析

長期増強を発見したBlissはアラキドン酸がメッセンジャーとして働いていることを示した。しかし、既に述べたようにcPLA₂α欠損マウスは正常な長期増強を示した。可能性は、アラキドン酸が関与しているという観察がアーチファクトか、あるいは別の酵素が不飽和脂肪酸鎖の放出を促しているという可能性である。今回、マウスデータベースの詳細な解析から、βと呼ばれるC2ドメインを持つ酵素が4種類、また、γが二種類存在することが明らかとなった。図2に細胞質型ホスホリパーゼA2（α、β、γ）の構造を示した。βの4種はいずれもC2ドメインを持ち、カルシウム依存的にアラキドン酸などの不飽和脂肪酸を切り出すことが確認された。これらの一部は脳にも局在しており（部位や細胞などはまだ同定できていない）、グルタミン酸刺激やカルシウム上昇により、生体膜へ移行し、そこで脂肪酸を切断する可能性が示唆された。

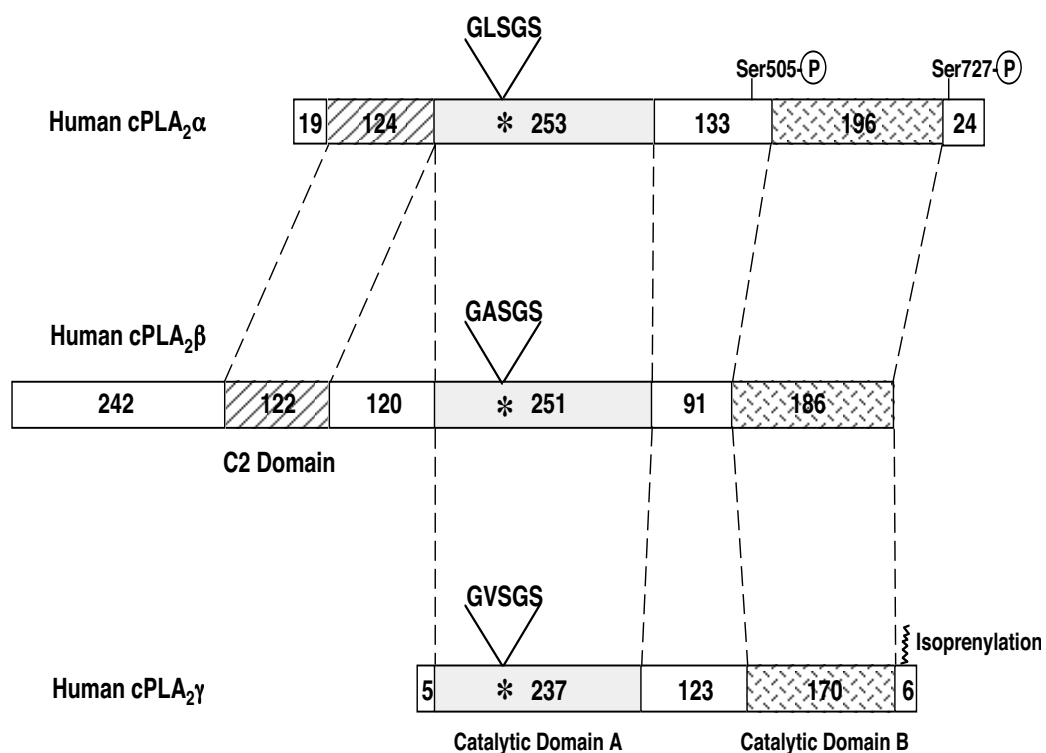


図2 細胞質型ホスホリパーゼA2の各種

α、βはいずれもC2ドメインを持ち、カルシウム刺激に応じて生体膜へ移行する。γはC2ドメインを持たないが、C末端のイソプレニル基により小胞体膜へ結合している。

(4) cPLA2 γ の特性の解明

ヒトcPLA2 γ は10年以上前に報告された分子であるが、その性質については詳細な解析はなかった。本酵素は脳その他、心、筋肉など全身に存在している。酵素はin vitroでホスファチジルエタノールアミン (PE) を良い基質とし、低濃度の界面活性剤で劇的な酵素活性の増加を認めた。また、本酵素は過酸化水素添加などの酸化ストレスにより、活性化されることも明らかとなった。そこで、酵素を過剰発現した細胞と通常の細胞のリン脂質の脂肪酸組成をLC-MS (液体クロマトグラフィー、質量分析装置) で検討したところ、酵素発現細胞では、ホスファチジルエタノールアミンの二位の高度不飽和脂肪酸が増加しているという結果を得た (図3)。この発見は、ホスホリパーゼA2 γ の活性化は膜のリモデリングの初発反応ではないかということで高く評価された。すなわち、ホスホリパーゼA2の本来の反応である、脂肪酸の切り出しが、続いて、別の酵素を活性化し、グリセロリン脂質の二位への高度不飽和脂肪酸の取り込みの引き金となるのか、あるいは、二位への高度不飽和脂肪酸の転位反応も併せ持つかのいずれかの可能性を示すものである。本研究結果が一つのきっかけとなり、膜のリン脂質の網羅的、動的解析の必要から、全国で初めて、東大に脂質メタボローム講座が開設された。

(5) ロイコトリエン合成酵素の局在変化

ロイコトリエン合成酵素のうち、5-リポキシゲナーゼに関しては、群馬大学グループの結果を参照されたい。また、ロイコトリエンC4合成酵素は核膜や小胞体に埋め込まれた膜タンパクで、脳では視床下部や脳下垂体に局在している。その動態が不明であったロイコトリエンA4水解酵素について細胞内の局在変化を詳細に解析したところ、核内外の移動はC末端に存在するアルマジロリピートの数によること、また、その移動は主としてチロシンリン酸化酵素 (実体は不明) により制御されていることが明らかとなった。本酵素も核内に出入りすることが明らかとなったが、この生理的意義は不明である。実際高濃度のロイコトリエンB4 (酵素反応産物) は核内受容体にも結合するので、我々がかねてから主張している生理活性脂質のdual receptor仮説

との関連に注目して、今後の研究を進めたい。

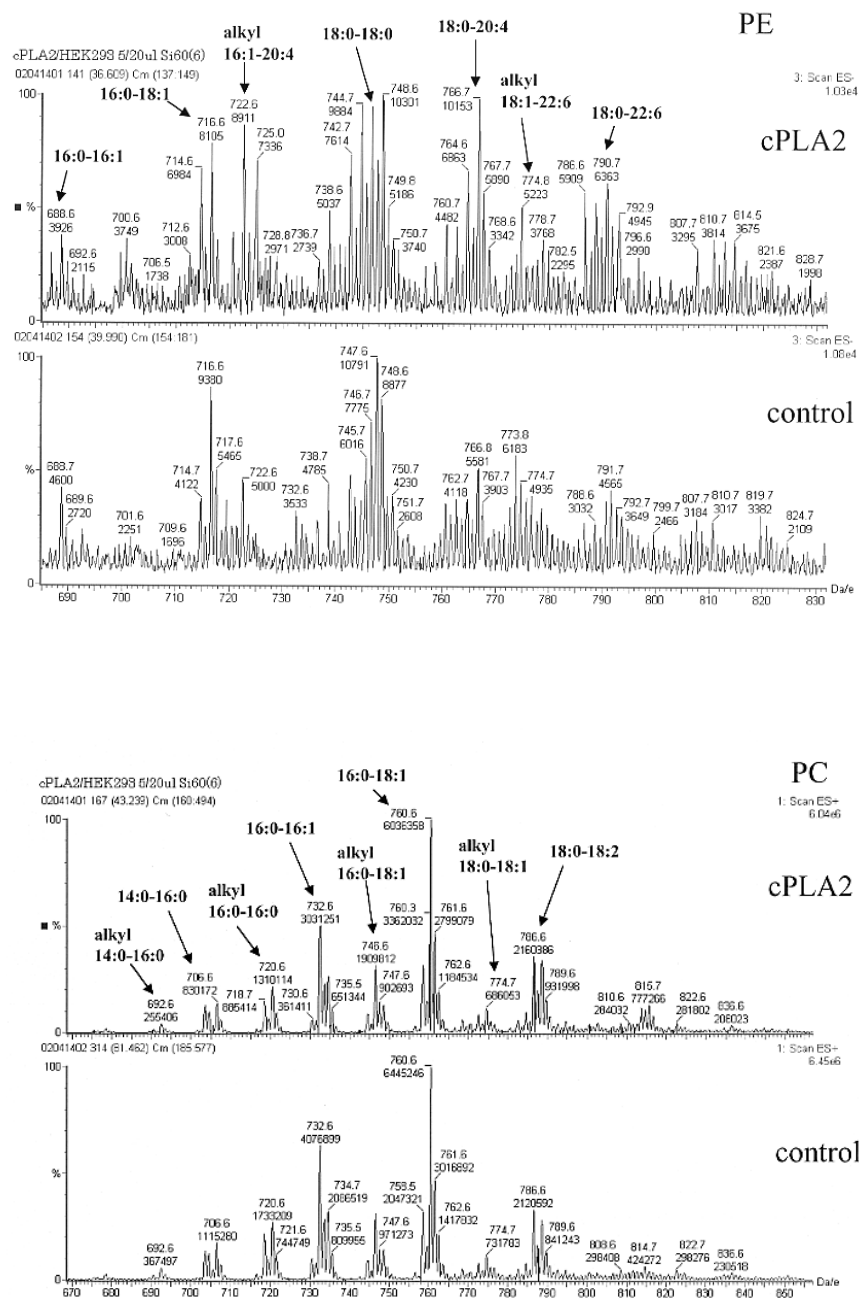


図3 cPLA2 γ の過剰発現を行った細胞では、ホスファチジルエタノールアミン (PE) において、高度不飽和脂肪酸の含量が増加していた。このことは、in vitroでの酵素の基質特異性と一致した。

2. 脂質メディエーターの受容体に関する研究

(1) ロイコトリエン受容体の研究

プロスタグランディンは9種類の受容体を持つがロイコトリエン類縁体の受容体は5種類が単離されている。ロイコトリエンB4高親和性受容体 (BLT1) は本プログラム開始前に単離したが、その後、ロイコトリエンB4第二受容体 (BLT2, 低親和性で幅広いリガンド特異性を持つ)、また、ロイコトリエンC4, D4を認識する二種類のマウス受容体を単離した。研究成果は以下の通りである。

1) ロイコトリエン受容体単離、その性質の解析

ロイコトリエンB4の高親和性受容体のプロモーターを解析し、発現パターンが炎症細胞に偏っている機構が主として、CG島のメチル化によるものであることを明らかにした。また、この過程でプロモーター領域に40%を越える別のGタンパク共役型受容体があることを見だし、これがロイコトリエンB4の第二受容体であることを明らかとした。第二受容体は全身に幅広く発現していた。第一受容体、第二受容体の共役するGタンパクやシグナル伝達の、拮抗薬の反応性の異なりなどを解析し、報告した。マウス、ラット、モルモットの同受容体を単離し、遺伝子構造を解析した。ロイコトリエンC4, D4を認識する二つの受容体をマウスより初めて単離した (CysLT1, CysLT2)。CysLT1は肺、小腸、脾臓に多く、他方、CysLT2は肺の他、脳、腎臓、小腸などに多いことが明らかとなった。また、マウスの系統により著しく発現量が異なることを明らかにした。

2) ロイコトリエンの機能に関する研究

ロイコトリエンB4は強力な炎症細胞の遊走作用があることが知られており、天然の分子では最も強力な遊走機能を持っている。実際、この受容体を高発現した上皮系細胞 (CHO cells) はex vivo実験 (ボーデンチャンバーアッセイ法) でも遊走を示したが、さらにin vivoのモデルに用いた。虚血再灌流モデルで予め蛍光標識した細胞を静注すると、本細胞は損傷部位に集積した。予め受容体拮抗薬を投与した動物ではCHO細胞も集積せず、また、組織損傷も軽度であった。この結果は、虚血

再灌流モデルでは、局所でロイコトリエンB4が産生され、集められている好中球などが組織障害を引き起こしていることを示すものである。さらに、この実験は細胞を用いた薬剤やsiRNAなどのデリバリーに応用できる可能性を示した。ロイコトリエンB4第一受容体欠損マウスの詳細な解析から、ロイコトリエンB4が単に炎症に働くだけでなく、Th2型の免疫反応に深く関わっていることが明らかとなった。ロイコトリエンC4, D4はミクログリアに作用し、この受容体を介して遊走や活性化などを引き起こす。この受容体は主として第一受容体 (CysLT1) である。これに対して、第二受容体 (CysLT2) の生理機能、病態での役割はほとんど明らかとなっていない。そこで、第二受容体欠損マウスの作製を新潟大学との共同研究で成功した。このマウスの解析を通して、中枢系、特に神経内分泌系やバゾプレッシン作用におけるこれら脂質メディエーターの機能が明らかになると思われる。

(2) PAF受容体の研究

血小板活性化因子 (PAF) は、*in vitro*で血小板凝集以外にも平滑筋収縮、白血球遊走をはじめ多彩な作用を示すアルキルエーテルリン脂質である。PAFの作用は細胞膜上に発現している一種類のGタンパク質共役7回膜貫通型受容体を介して及ぶ。当研究室ではPAF受容体のcDNAクローニングに世界ではじめて成功し、この受容体が好中球・マクロファージ等の炎症性細胞および神経系では神経細胞やミクログリアに発現していることを報告している。しかしながら、PAF及びPAF受容体が神経系で担う生理学的及び病態生理学的役割を明確に示した報告はない。本研究は、PAF受容体欠損マウスを主に用いて神経系におけるPAF受容体の働きを明らかにすることを目的とした一連の実験から構成される。

1) 多発性硬化症におけるPAF受容体の役割

ヒトの疾患である多発性硬化症の動物モデル（実験的アレルギー性脳脊髄膜炎：EAE）をPAF受容体欠損マウスに発症させた。EAE発症に要した平均日数や発症率は野生型マウスと比べてPAF受容体欠損マウスでは違いが認められなかった。しかし四肢の麻痺の程度をスコア化したところ、PAF受容体欠損マウスは野生型マウス

に比して有意に症状が軽いことが明らかになった。以上の結果から、PAFにEAEを増悪化させる作用があることが示唆された。

2) 疼痛におけるPAF受容体の役割

PAF受容体欠損マウスの後足の踵に熱及び化学刺激を加える実験により、生理的条件下におけるPAFの痛覚への関与を調べた。PAF受容体欠損マウスは両方の侵害刺激に対し、野生型マウスに比べ有意に鈍麻になっていた。また痛覚伝達経路を担う神経細胞のうち、一次求心性神経細胞の細胞体（後根神経節）においてマウスPAF受容体のmRNAの発現がRT-PCRによって認められた。またラット後根神経節の神経細胞を*in vitro*で培養してPAFで刺激したところ、細胞内カルシウム濃度の上昇が確認された。以上の結果からPAFの痛覚増強作用が示され、この機序には少なくとも一次求心性神経細胞が関与することが示唆された。

3) 神経伝達物質放出におけるPAFの役割

マウス的大脑スライス標本で海馬CA1領域の前シナプスからの神経伝達物質の放出能を、対パルス促進と後テタヌス性増強という2つの電気生理学実験で観察した。その結果、PAF受容体欠損マウスでは二つの現象がともに野生型マウスに比べ抑制されていることがわかった。また後テタヌス性増強の抑制はPAF受容体アンタゴニスト (WEB2086) の投与によっても野生型マウスで観察できた。以上の結果から、PAFには前シナプスからの神経伝達物質放出促進作用があることが示唆された。

4) 神経細胞移動におけるPAFの役割

PAF受容体欠損マウスの胎児の小脳には、形態異常が認められた。また*in vitro*における小脳顆粒細胞の移動速度は、野生型マウスのものに比べて有意に遅く、PAF受容体アンタゴニスト (WEB2086) で処理した野生型マウスの顆粒細胞の移動速度と同等であった。LIS1はPAF分解酵素 (PAFアセチルヒドロラーゼ) の活性調節サブユニットであり、ヒト神経細胞移動の疾患であるI型滑脳症の原因遺伝子がコードするタンパク質でもある。PAF受容体とLIS1の同時欠損マウスの顆粒細胞では、

PAF受容体単独の欠損マウスの細胞よりもさらに移動速度が減少していた。一方、PAF受容体欠損マウスの顆粒細胞をPAFで刺激すると、意外なことに移動速度が変化したことから、PAFのPAF受容体非依存的な作用の存在が考えられた。なお、この作用はPAF受容体とLIS1の同時欠損マウスでは認められなかった。以上の結果は、PAFがPAF受容体依存的経路と非依存的経路によって顆粒細胞の移動を調節すること、そしてPAFの神経細胞移動への作用にはLIS1が強く関与することを示唆している。

5) PAF受容体アンタゴニスト活性を持つギンゴライドB派生物の合成

多様な神経作用を示すイチョウの抽出物に含まれるギンゴライドやビロバライドは、独特の構造を持つテルペントリラクトン (TTL) である。しかし中枢神経系におけるこれらTTLの標的分子は明らかになっていない。調べたTTLのうちギンゴライドBはPAF受容体アンタゴニスト活性が最も強かった。そこでTTLが結合するタンパク質の光標識を目的として、光反応基や蛍光基を持つギンゴライド派生化合物を調製し、クローン化PAF受容体への結合能力を調べた。その結果、光反応性の芳香基を持ったギンゴライド派生化合物はKiが0.09-0.79 μ Mで、強いPAF受容体アンタゴニストであることがわかった。したがってこの派生化合物は、光標識実験によってPAF受容体へのギンゴライドの結合を明確にするための優れたリガンドであることが示された。光反応基とともに蛍光基を導入したギンゴライド化合物も、PAF受容体アンタゴニストとしての作用を依然として保っていたので、これらの化合物を使えば光標識後に標識物の動態を追うことが可能になるであろう。

6) ヒトPAF受容体遺伝子の多型

ヒトPAF受容体の第三細胞内ループにある224番目のアラニン残基をアスパラギン酸残基に置換する変異遺伝子を発見した。この変異は日本人において対立遺伝子の7.8%に認められた。この変異が受容体の機能に及ぼす影響を調べるために、変異PAF受容体と野生型PAF受容体をCHO細胞に安定的に発現させたところ、変異PAF受容体には発現量の違いや、PAFとPAFアンタゴニスト (WEB2086) に対して

の親和性に異常が認められなかった。しかしカルシウム反応、イノシトールリン酸産生、アデニル酸シクラーゼ活性の阻害、化学走性等のPAFの細胞内シグナル伝達に部分的ながらも野生型受容体に比べ有意な減弱が認められた。以上の結果はこの自然変異PAF受容体にはGタンパク質との共役に障害があることを示唆し、この変異体の存在によってPAFへの反応性やPAF関連疾患の素因、PAFアンタゴニストへの反応性の個人差を説明することができるかもしれない。

(3) 新規リゾホスファチジン酸受容体の研究

LPA（リゾホスファチジン酸）は最も簡単な構造のリン脂質で様々な経路で合成される（群馬大発表参照）。LPAは細胞増殖、分化や神経細胞の発生遊走などに関与していることが報告されている。現在のところ、3種類の受容体 (Lpa1, 2, 3) が単離され、その性質が詳細に解析されてきた。しかし、これらの遺伝子欠損マウスが著明な表現型を示さない理由の一つとして、これ以外の受容体が存在する可能性が指摘されてきた。今回、数多くの孤儿受容体（オーファン受容体）の脂質リガンドを探索する過程で、既存のLpaと全く構造を異にする第4のLPA受容体があることを見だし、これをLpa4と名付けた（図4）。この分子の機能はノックアウトマウスの解析から明らかになっていくものと考えられるが、アデニル酸シクラーゼの活性化を引き起こすなど、従来の受容体とは異なる性質を示した。また、興味深いことに本受容体の既存のLpa受容体との相同性は25%程度である。受容体のどのアミノ酸が脂質LPAを認識するか、興味深い問題である。また、この発見は構造に基づくリガンドスクリーニングに一定の限界があることを示す良い例となった。なお、これより前にプロスタグランディンD2を認識する二つの受容体 (DP, 及びCRTH2) の相同性はやはり30%以下と非常に低いとの報告があった。また、アセチルコリンやグルタミン酸も全く異なる受容体（イオンチャネルとGタンパク共役型受容体）を持つことが知られており、本例が最初ではない。

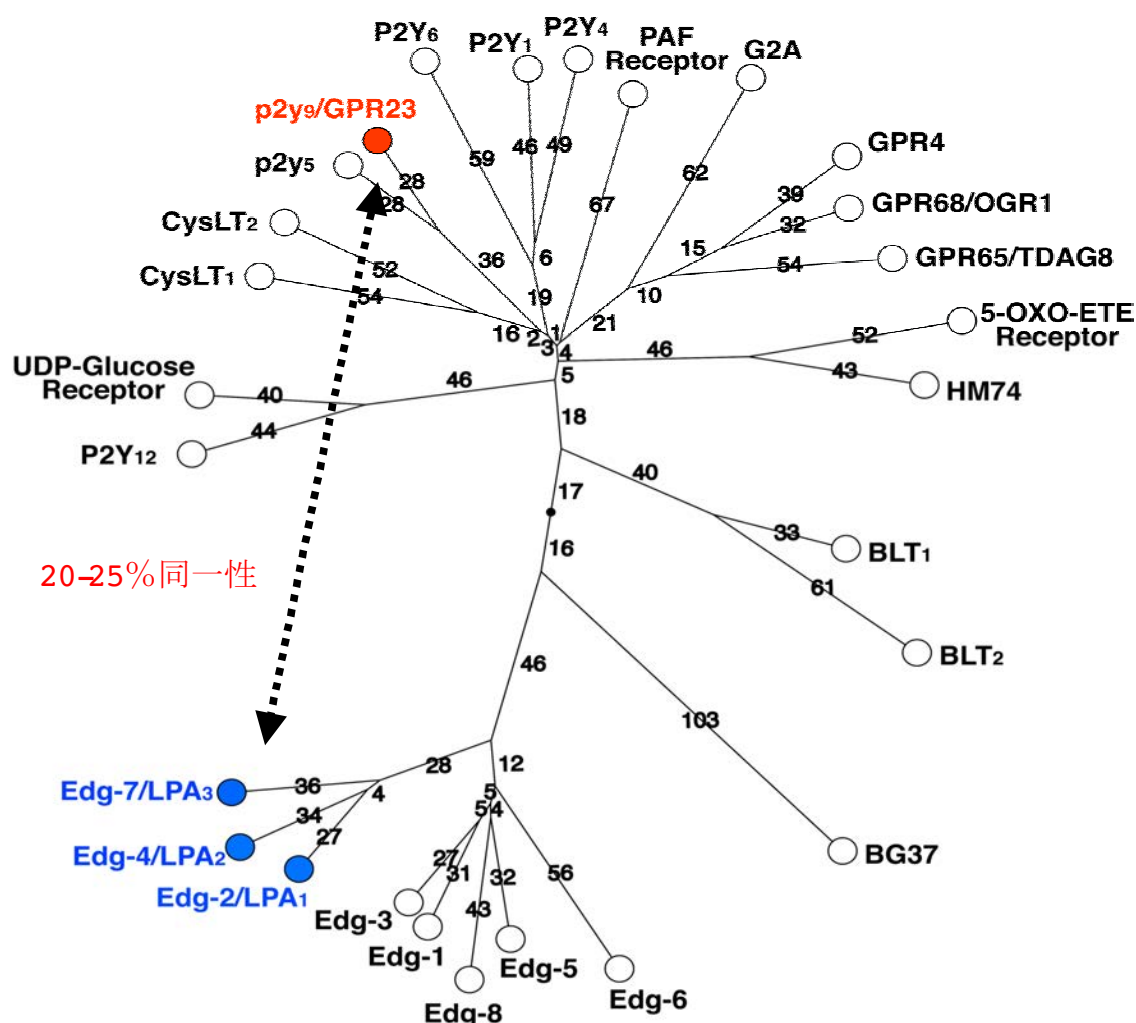
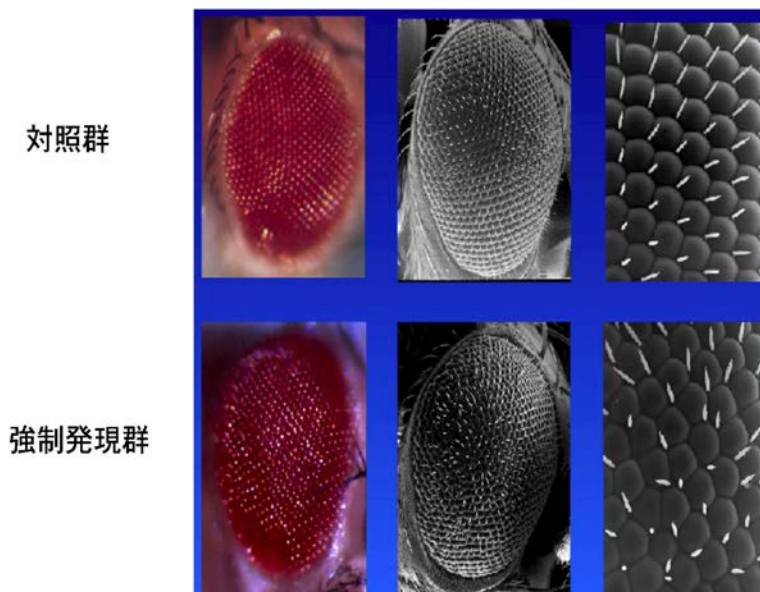


図4 新規に発見されたLPAの第4の受容体 (Lpa4) はプリン性受容体のファミリーに属し、P2y9/GPR23と名付けられていた。近くに存在するP2y5はLPAを認識せず、遙か遠くに存在する(構造の相同性が低い) Lpa1-3がやはりLPAの受容体である。

(4) オープン受容体の脂質リガンド探索

ヒトゲノムの解析結果より、Gタンパク共役型受容体は全体で700近くあり、嗅覚受容体を除いても120が未だにリガンドの不明な孤児受容体（オープン受容体）である。我々は1991年にPAF受容体をクローニングし、これは生理活性脂質受容体の最初の報告となったが、その後約30種類の生理活性脂質受容体が発見されている（図5参照）。群馬大学グループと我々は平行して、これらの天然脂質リガンド探索を進めている。(3)で述べたp2y9はその最初の成功例であるが、今後も新規の脂質リガンドの探索を進めたい。

ショウジョウバエにおける ホスホリパーゼDの役割の解析



幼虫の眼の成虫原基でdPldを発現したところ、成虫の複眼で rough eyeの表現型が見られた。複眼の発生過程で異常が生じ、光受容細胞や色素細胞の脱落が起こり、複眼の形成が正常に行われなかった結果と推定された。

図5 ホスホリパーゼD強制発現による複眼発生異常

(2) 研究成果の今後期待される効果

この分野では世界をリードする研究を進めている。特に酵素と受容体の双方を研究している点が特徴である。種々の遺伝子改変マウスの表現型の解析から新しい脂質メディエーターの機能が明らかとなっており、また、創薬に与えるインパクトも大きい。実際、多くの企業研究所にアッセイ系などを提供しており、良い拮抗薬や阻害剤のスクリーニングを加速している。また、神経異常や生殖異常などの発見は、これらの薬剤の予想される副作用を警告することとなっている。

3. 2 脂質生化学グループ（群馬大学医学部）

(1) 研究内容及び成果

細胞膜リン脂質の生合成と分解に関する研究を行い、さらに細胞膜リン脂質から生成される脂質メディエーターがいかに合成されどの様な生理作用を持っているかを明らかにすることを目的とした。

細胞膜リン脂質合成の律速酵素の転写制御に関する研究を行った。細胞膜分解酵素の1つであるホスホリパーゼD (PLD) の個体における役割を解析する目的で、ショウジョウバエに時期特異的、場所特異的に本酵素を発現させ表現型を解析した。脳におけるリゾホスファチジン酸 (LPA) および2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) の産生系路に関する研究を行った。ロイコトリエン受容体や血小板活性化因子受容体の発現および機能に関する研究を行った。リガンドの不明なGタンパク質共役型受容体のリガンドスクリーニングをラット脳からの抽出脂質などを用いて行った。

1. ホスファチジルコリン生合成経路の転写制御：

細胞膜リン脂質の主要な成分であるホスファチジルコリン生合成の律速酵素であるCT α (Phosphocholine cytidylyltransferase α) の転写に転写因子Ets-1が重要な転写因子として働いていることを見出した。Ets-1は癌遺伝子産物の1つであり腫瘍や増殖に関与することで知られている。さらに、Ets-1はSp-1と結合して協調的に転写を促進することを見いだした。また、Etsファミリーの別な転写因子であるNetは強力にCT α の転写を抑制することを見いだした。これらの成果は、膜リン脂質合成の機序の解明が細胞分裂や腫瘍増殖の制御につながることを示している。

2. ショウジョウバエを用いたホスホリパーゼDの機能解析：

リン脂質分解酵素の1つであるホスホリパーゼD (PLD) の個体における役割を解析する目的で、ショウジョウバエに時期特異的、場所特異的に本酵素を発現させ表現型を解析した。ショウジョウバエの幼虫において様々な成虫原基のプロモーターを用いてPLDを発現させると、各々複眼、口吻、触覚器などの感覚器官に異常を生じることを見出した。これらの成果は、個体レベルにおいてPLDの機能を解析した最初の例である。

3. 生理活性脂質の産生系路に関する研究

- (1) 5-リポキシゲナーゼ (5-LO)：ロイコトリエン産生の鍵を握る酵素である5-LOの活性は複雑に制御されており、その制御機構の1つに細胞内局在の変化がある。

GFPとの融合タンパク質をCHO細胞に安定的に発現させて、細胞内局在に関する研究を行った。その結果、5-LO配列中に核内移行配列 (NLS) を見だし、またレプトマイシン感受性の核外輸送機構を発見した。さらに核外輸送の引き金としてストレス刺激によるリン酸化経路を見いだした。

(2) ホスファチジン酸 (LPA) 合成酵素：LPAは細胞増殖や細胞形態変化をもたらす脂質性リガンドとして注目を集めており、その受容体が最近次々と明らかにされてきている。脳においては神経細胞の分化、誘導との関連が指摘されている。最近、血清中のLPA産生酵素がautotaxinと呼ばれていた腫瘍転移増殖因子であることが明らかにされたが、脳におけるLPA産生機序は明らかにされていない。本研究において、ラット脳の膜分画にautotaxinとは異なるLPA産生酵素を発見し、可溶化、部分精製に成功した。現在さらに精製を進めている。

(3) 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) 産生酵素：マリファナ受容体として報告されたカンナビノイド受容体CB1はグルタミン酸受容体と並んで脳内に最も多く存在する受容体である。CB1の内因性リガンドである2-AGは、グルタミン酸刺激によるポストシナプスにおけるPI代謝回転によって生じるジアシルグリセロール (DG) から産生され则认为られているが、その産生酵素は明らかにされていない。本研究では、ラット脳の細胞質に存在する2-AG産生DGリパーゼを発見し、部分精製に成功した。現在さらに精製を進めている。

4. 生理活性脂質受容体に関する研究

(1) オーファン受容体のリガンドスクリーニング：ゲノム配列の解析や、データベースサーチなどより、脂質をリガンドとする可能性のあるオーファンGPCRを20個選出し、培養細胞に発現させてシグナルを解析することによる脂溶性リガンドの同定を目指した。20個のうち半数は脳に強く発現している。アッセイ法としては、細胞内カルシウム濃度の上昇、細胞内cAMPの増減、レポーター遺伝子の発現、GTP γ S結合を用いた。リガンド候補として、合成もしくは購入した脂質ライブラリーや、ラット脳からの抽出脂質を用いた。現在までに、カルシウム法で1個、レポ-

ター遺伝子法で3個の陽性GPCRを見いだしている。現在それらのGPCRに関して、リガンドの分離、同定、さらなるシグナル解析を進めている。

- (2) 副腎皮質ステロイドのBLT1発現誘導：副腎皮質ステロイドは、抗炎症薬として広く使われている。その機序は、サイトカイン及びその受容体の発現抑制ならびにプロスタグランジン合成酵素の発現抑制である。しかし、同じアラキドン酸代謝物であるロイコトリエン系への副腎皮質ステロイドの効果はほとんど研究されてこなかった。本研究において、副腎皮質ステロイドが白血球の分化誘導過程でロイコトリエンB4受容体 (BLT1) の発現増加と機能亢進をもたらし、さらに成熟白血球においてはアポトーシスを抑制することを明らかにした。このことは、白血球が主体の炎症反応において副腎皮質ステロイドが炎症を増悪させる危険性を指摘している。
- (3) その他：マウスのロイコトリエン受容体 (CysLT1およびCysLT2) をクローニングし組織分布および細胞内シグナルの解析を行った。マウスのマクロファージにおいて、血小板活性化因子受容体を介するリガンド不活性化機構が存在することを明らかにした。肝切除後のクッパー細胞において、血小板活性化因子受容体が誘導され炎症反応に寄与している可能性を示した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ホスホリパーゼDはクローニングされてから10年近く経つが、未だにノックアウトマウス、トランスジェニックマウスが作製されず、その機能は曖昧なままである。その意味で本グループのショウジョウバエの系はオリジナリティーが高いと思われる。しかし、そのメカニズムの解明が今後の課題といえよう。酵素精製およびcDNAクローニングを行うことにより、2-AGやLPAなどの生理活性脂質の脳における産生系路を明らかにし、種々のオーファン受容体のリガンドを見つけることが出来れば、創薬などに結びつく可能性もある。

3.3 電気生理グループ（新潟大学脳研究施設）

(1) 研究内容及び成果

1. 聴覚野時間差情報処理とその背景にあるメディエーターの解析

聴覚情報処理においては、時間的な情報が如何に検出され、処理されているかという点が不明である。特に言語などでクリティカルな遅い（0.1－10秒）範囲での音の時間差が如何に検出され、処理されているかは謎である。またその背景に脂質メディエーターを含む情報伝達系が関与している可能性がある。我々は大脳聴覚野にこの範囲の時間差の検出・保持機構が存在するのではないかと考え、モデル実験を行った。大脳聴覚野の脳切片標本を作成し、白質上の二点を高頻度で刺激した。この高頻度刺激を二点間で時間差をつけて行うことで、それぞれの刺激に対する反応（LTPの起こり方）がどうなるかを解析した。刺激間の時間差が0.5秒から10秒存在した場合、先行刺激にのみ選択的にLTPが起きた。時間差がないか15秒以上の場合、そのような差は明確でなかった。この現象のメカニズムとして先行刺激によって抑制ニューロンが刺激された結果、2度目の刺激効果が薄れるという説明が存在し得る。しかしGABA_A受容体やGABA_B受容体の阻害剤を用いても効果がなかった。更に高頻度刺激によるカルシウム上昇反応を見ても、一度目と二度目で殆ど差が見られなかった。さらにLTPの起きる範囲を可視化するため、白質刺激に対するカルシウム上昇反応を画像として捉えた。その結果、時間差をつけた高頻度刺激を行うと、先行刺激に対するLTPが広範囲に起きるのに対し、後の刺激に対しては狭い範囲でしか起きないということが明確に示された。

次にこのような時間差をもったシナプス入力間の干渉を可能にするメッセンジャー系の検討を行った。GABA受容体、NO合成酵素、ホスホリパーゼA2の阻害剤を含む種々の薬物の効果を検索したが、当該の効果を発揮したのはアセチルコリンのムスカリン受容体の阻害剤である、アトロピンであった。さらにムスカリン受容体のうちでもM1受容体に選択的なピレンゼピンがアトロピンと同等の効果を持つことが判った。また、アトロピン存在下でも、カルバコールを投与することによって長期増強の時間依存性が回復できることから、必ずしもアセチルコリンが刺激によって一過性にでる

必要はなく、持続的な放出でも良いということが分かった。M1受容体は様々なセカンドメッセンジャー系とカップルすることが考えられるが、M電流を抑制的に制御するというのがその一つである。M電流を抑制する作用を持つ薬剤（リノピルジン）をアトロピンと同時に投与すると、長期増強の時間依存性が回復することが分かった。以上の薬理学的な実験から推測すると、脳内で持続的に放出されるアセチルコリンがM1受容体を介してM電流を抑制し、そのことが長期増強の時間依存性を成立させるためには必須であると思われる。

次に行動学的な実験系を用いてラットの音順序弁別能の解析を行った。実験にはスキナー箱を用い、飲水制限をしたラットに（A音→B音、休み、A音→B音、休み…）または（B音→A音、休み、B音→A音、休み…）の音パターンをランダムに提示した。そのうち一方の音パターンの提示中にラットが給水口をなめると報酬として水を与えた。このような学習を毎日12時間、4日間連続で行うと、動物は報酬がもらえるパターン提示中により高い確率で給水口をなめるという反応を示すようになった。ここでアセチルコリンのムスカリン受容体阻害剤のうち、脳血液関門透過型（アトロピン）と不透過型（メチルアトロピン）の効果を解析した。アトロピン腹腔内投与（10mg/Kg）で順序弁別は抑制されたが、血液脳関門不透過性のメチルアトロピン（10mg/Kg）は無効だった。またコリン作働性ニューロンに免疫毒性を持つ192IgG-saporinの脳室や聴覚野投与により順序弁別は抑制されたが、二音の弁別は抑制されなかった。脳切片標本での結果と行動学的な解析の結果を照合すると、アセチルコリンのムスカリン受容体に依存する聴覚野LTPの時間依存性が実際に動物の聴覚入力の情報処理に用いられていると結論される。

2. フラビン蛋白蛍光法による脳機能イメージングを用いた脳活動・血流連関の解析

神経細胞が興奮すると細胞内カルシウム濃度が上昇し、これによってミトコンドリアの酸素代謝が亢進し、電子伝達系の一員であるフラビン蛋白が酸化型になる。酸化型のフラビン蛋白は青い励起光の下に緑色の自家蛍光を発するため、緑色自家蛍光を測定すれば神経活動のパターンをイメージとして捉えることが出来る。我々はこの原

理を脳機能イメージングに応用可能かどうかを検討した。まず大脳切片で電気刺激に対して青色励起光に対する緑色自家蛍光が大きく変化することを見出した。この波長はフラビン蛋白質の蛍光に相当する。また反応はテトロドトキシンや無カルシウム液、無グルコース液、フラビン蛋白質の特異的な阻害剤のCPIなどでブロックされた。以上から少なくとも脳切片標本のレベルではフラビン蛋白蛍光を用いた神経活動の光学的な記録が可能であることが判った。次にウレタン麻酔下のラットの大脳皮質表面を露出し、脳切片標本と同様のフラビン蛋白蛍光変化が観察できるかどうかを検討した。タングステン電極を脳に直接刺入し、電気刺激を加えると刺激局所の蛍光強度が上昇した。また前肢・後肢の機械的刺激に対する体性感覚野の、また音刺激に対する聴覚野の反応も記録した。これらは0.1-0.3秒程度の時間分解能をもち、また振幅が電気刺激に対して20%、自然刺激に対して2-3%と非常に大きいという特徴を示した。これは従来の方法で得られる光学的な反応振幅と比べ10-100倍にも相当する。またこの方法で得た蛍光反応と電氣的に記録した電場電位の分布は非常に良い相関を示した。蛍光反応に引き続き、動脈血流の増加が吸光像として観察された。蛍光変化はDPIで阻害され、動脈血流の増加が吸光像の変化はNO合成酵素阻害剤で阻害された。また通常は片側後肢の機械刺激は対側の体性感覚野を興奮させるが、同側の体性感覚野を電氣的に高頻度で刺激した後に記録を行うと、片側後肢の刺激に対して両側の体性感覚野が反応を示すようになった。この結果は両側大脳皮質をつなぐ神経回路が活動依存性の可塑性を示すことを示唆する。さらにフラビン蛍光法を用い、弁別学習が成立した動物を麻酔して解析すると、報酬と連合させないコントロール刺激に対する感覚野の反応が特異的に抑圧され、報酬をもらえる手掛かり刺激のみに効率良く反応するように感覚野の神経回路可塑性が誘発されていることが判った。またフラビン蛋白蛍光法を覚醒マウスの大脳皮質活動のイメージングにも使用可能であることが判った。神経活動が高まると局所脳血流量が高まることは良く知られている。神経活動と血流量変化のカップリングはMRIやPETなどによって脳活動を画像化する際の重要な原理であるし、またこれによって高次脳機能が微妙に調節されている可能性がある。しかしそのメカニズムの詳細はまだ分かっていない。フラビン蛋白蛍光法の特徴の一つは

神経活動を表す蛍光変化と、神経活動によってトリガーされる脳血流量の上昇を両方捕らえることが出来るということである。即ち血流が増えると血管内のヘモグロビンが蛍光測定に用いる青や緑の光を強く吸収するので、動脈像が暗化するのである。この性質を利用して脳活動と脳血流量上昇のカップリングを解析したところ、インドメタシン投与によって血流量の上昇がブロックされた。すなわち脂質メディエーターがこのカップリングに大きな役割を果たすことが強く示唆された。さらにNO合成酵素阻害剤とインドメタシンを併用するとより完全に血流増加が阻害されることが示された。即ち脳活動と血流上昇のカップリングには脂質メディエーターとNO信号系によって二重に制御されていることが判った。

(2) 研究成果の今後期待される効果

現在脳活動と血流のカップリングに関する成果をホスホリパーセA2、各種受容体欠損マウスの解析に応用するため実験進行中である。本研究グループは常に新しい手法を開発しており、オリジナリティーが高い。この切り口から、脂質メディエーターの新しい機能が明らかとなる可能性もある。

3. 4 脳形態学グループ（愛知コロニー研究所）

(1) 研究内容及び成果

1. 血小板活性化因子の神経細胞移動への関与

大脳の脳回が形成されない先天性脳奇形の滑脳症を主徴とするMiller-Dieker症候群の原因遺伝子であるLis1の遺伝子産物LIS1は、血小板活性化因子 (PAF) アセチルヒドrolラーゼの β サブユニットと同一である。Lis1遺伝子欠損マウスでは神経細胞移動異常を発症することが知られているが、LIS1タンパク質の機能が脂質メディエーターとしてのPAFと関わるものかどうかは明らかではない。我々は、PAF受容体遺伝子欠損マウス (PAFR-KO) の脳を形態学的に解析した。1日・3週・5週・8週齢のPAFR-KOと野生型マウスについて、1) マクロ的脳形態、2) 大脳皮質・海馬・小脳皮質の層構造、3) 大脳皮質の成熟度、4) 小脳皮質の成熟度、5) 異所性ニューロンの有無、

6) 脳室周囲germinal matrixの状態、7) 髄鞘形成について検討した。その結果、いずれの齢においても、これらの項目について両マウス間に大差は認められなかった。一方、小脳顆粒細胞の凝集培養系で、野生型細胞に比べて、PAFR-KO細胞の移動が遅いことが証明された（三田村ら）ことから、PAFR-KOの胎生期の小脳外顆粒層の厚さを計測したところ、胎生17.5日齢のPAFR-KOでは外顆粒層の厚さが野生型に比べて有意に厚くなっていた。また、胎生14.5日齢でも、外顆粒層の厚さがPAFR-KOで厚い傾向が見られた。従って、PAF受容体は、小脳外顆粒層形成の最初期に、in vivoにおいても顆粒細胞の移動速度調節に関与する可能性が示唆された。

2. 細胞質型ホスホリパーゼA2の脳内分布とニューロン内発現様式

細胞質型ホスホリパーゼA2 (cPLA2) は、アラキドン酸カスケードにおける律速酵素であり、脳や他の臓器でアラキドン酸の遊離およびそれに続くアラキドン酸代謝に重要かつ調整的な役割を担う。我々は、成獣および発達途中のマウスの脳および神経細胞でのcPLA2の局在を明らかにし、樹状突起およびスパインの形態形成におけるアラキドン酸およびその代謝物の機能について解析を行なった。まず、cPLA2の発現を免疫組織化学的に調べたところ、成獣マウス脳では小脳プルキンエ細胞に選択的に発現しており、その細胞体、軸索、樹状突起およびスパインに分布していた。発達段階のプルキンエ細胞では生後1日目からcPLA2の発現が確認でき、その後の発達とともに増加していた。次に、プルキンエ細胞での発現を小脳分散培養系を用いて解析したところ、培養開始5日目からcPLA2の発現が確認でき、こちらも培養日数とともに発現量が増加していた。小脳切片での局在と同様、培養プルキンエ細胞においても、cPLA2はその細胞体、軸索、樹状突起およびスパインに分布していた。In vivoおよび培養下でのcPLA2の発現は発達途中のプルキンエ細胞の樹状突起が伸展する時期と一致していた。さらに、プルキンエ細胞発達におけるアラキドン酸代謝物の役割を解析するために、各種酵素阻害剤を用いた解析をおこなった。7日目の小脳分散培養に、lipoxygenase阻害剤であるnordihydroguaiaretic acidを5日間連続投与し、その影響を調べところ、スパイン頭部の最大径と最小径がともに増加していた。一方、スパイン頸

部の長さは変わらなかった。これに対し、小脳分散培養にcyclooxygenase阻害剤 (ibuprofenおよびindomethacin) を添加し影響を調べたところ、lipoxygenase阻害剤添加でみられたスパイン形態への影響は見られなかった。これらの結果は、発達段階および成獣の小脳プルキンエ細胞において、cPLA2とその下流のlipoxygenase経路が樹状突起の維持ならびにスパインの形態形成に役割を持つことを示している。

3. ロイコトリエンC4の神経内分泌機能への関与

ロイコトリエンC4合成酵素 (LTC4S) は、好酸球や内皮細胞においてロイコトリエン (LT) A4を基質としてペプチドLTを産生するkey enzymeであるが、その脳内における機能や分布は不明である。我々は、LTC4Sの脳内局在を知るために、マウスを用いて免疫組織化学的染色を行った。その結果、LTC4Sの免疫反応の主たる分布は視床下部下垂体後葉系と完全に一致した。即ち、視床下部の室傍核、視索上核、後視交叉核、視交叉上核の大型ニューロンの細胞体と、それらから出る軸索に極めて選択的に認められた。軸索での免疫反応は、視床下部下垂体後葉系投射路として知られている経路に沿って分布し、正中隆起の内層を経て、投射終末が存在する脳下垂体の神経葉に至るまで分布していた。LTC4S免疫反応のいま一方の分布として、扁桃核、中脳灰白質、手綱核に軸索の陽性像が認められた。LTC4Sとホルモンとの共存関係を二重免疫染色にて調べたところ、前者の視床下部下垂体後葉経路では、LTC4Sはバゾプレッシン含有ニューロンにのみ局在し、オキシトシン含有ニューロンとは局在を異にすることを確認した。また、後者の経路は視床下部外バゾプレッシン系に一致することを確認した。一方、LTC4Sと同じくLTA4を基質とするLTA4水解酵素は、免疫染色上、視床下部・下垂体に存在を証明できなかった。従って、LTC4Sは視床下部下垂体後葉系および視床下部外のバゾプレッシンニューロンにあって、神経内分泌機能と自律神経機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

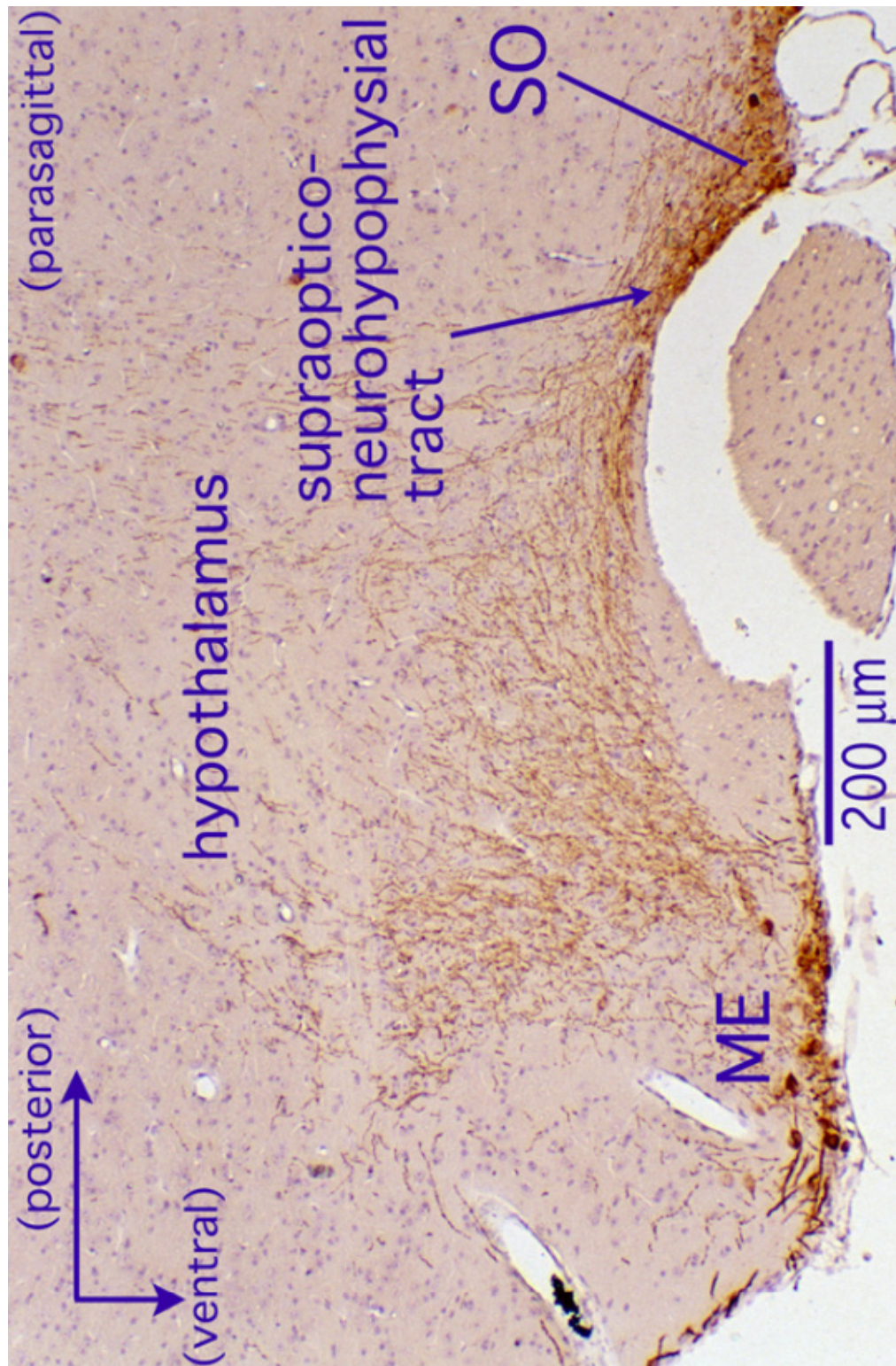


図6 ロイコトリエンC₄合成酵素の視床下部、視索上核、正中隆起での分布、神経細胞に一致した局在が観察される。

4. ロイコトリエンA₄ 水解酵素の脳内分布

白血球やミクログリアの強力な活性化因子として知られるLTB₄ を産生する酵素であるLTA₄ 水解酵素は、全身臓器に分布するが、脳内における分布の詳細は明らかではない。ここでは、LTA₄ 水解酵素の脳内分布を免疫組織化学的に検討した。以下に結果をまとめた表を示す。

表1 LTA₄ 水解酵素の脳内分布

Aグループ

1) 嗅脳系

嗅球糸球と糸球周囲細胞の軸索、嗅球前核

2) 非膝状体性視覚系

視神経、視索、上丘

3) 三叉神経脊髓路

4) 前庭蝸牛神経と前庭小脳連絡路

前庭神経、蝸牛神経

第9・10小脳小葉の顆粒層

5) 後索系

Bグループ

脳室近傍の小型細胞

Cグループ

大脳皮質（前頭、頭頂、側頭等）

次に、大脳新皮質に散在するLTA₄ 水解酵素陽性細胞の数を画像解析装置を用いて計測したところ、老化促進モデルマウス（SAM）の12か月齢では3か月齢に比して増加していた。以上のように、ロイコトリエンA₄ 水解酵素は、脳神経などを介する感覚系上行線維と脳室周囲小型細胞の細胞体に多く発現しており、大脳皮質では細胞体における発現が少数散在性に認められることがわかった。また、大脳皮質におけるロイコトリエンA₄ 水解酵素の発現は、加齢によって増加する傾向にあり、神経変性との関わりを示唆した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

この研究の結果は国際的にも大変注目されている。すなわち、細胞質型ホスホリパーゼA2の詳細な局在や加齢による変化が明らかとなり、さらに、全く予想外のロイコトリエンC4合成酵素の局在が明らかとなったからである。今後、ロイコトリエン系と、神経内分泌、また、バゾプレッシンを介した行動への関与など、新しい展開が期待される。それは、本グループがオリジナルに進めている加齢促進マウスへの展開も期待できる。

3. 5 創薬グループ（明治製菓）

(1) 研究内容と成果

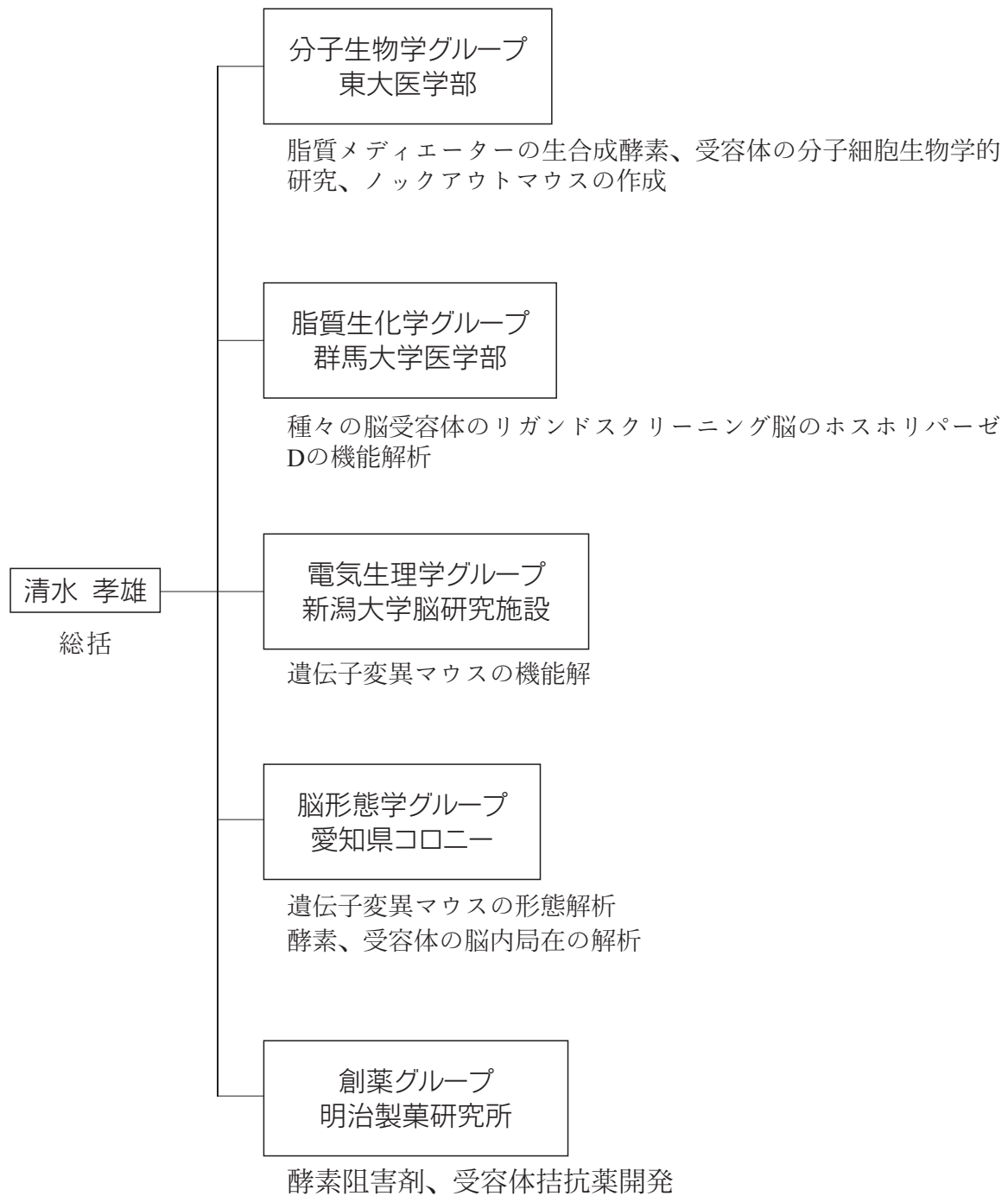
東京大学の分子グループより、遺伝子、遺伝子発現細胞などの供与とアッセイ系の指導を受け、化合物ライブラリーより、酵素阻害剤、受容体拮抗薬などのスクリーニングを進めているが、予期したような化合物を得るには至っていない。

(2) 研究成果の今後期待される効果

気管支喘息、アレルギーリウマチ、抗炎症などの薬剤の開発が期待できる。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

① 分子生物グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
清水 孝雄	東大医	教授	研究総括・指導	平成10年12月～平成15年11月
横溝 岳彦	東大医	助教授	受容体グループ指導	平成10年12月～平成15年11月
谷口 雅彦	東大医	助手	発生工学指導	平成10年12月～平成15年11月
石井 聡	東大医	助手	PAFの神経作用	平成10年12月～平成15年11月
高橋 利枝	東大医	助手	脂質の解析	平成10年12月～平成15年11月
魚住 尚紀	東大医	助手	ホスホリパーゼA ₂	平成10年12月～平成15年11月
佐藤 元康	東大医	学振研究員	フェロモン受容体	平成10年12月～平成15年11月
岸本 幸治	科学技術振興事業団	CREST研究員	KIDS cPLA ₂	平成11年 4月～平成15年11月
三田村 (徳岡) 涼美	科学技術振興事業団	CREST研究員	PAFの神経機能解析	平成10年12月～平成15年 6月
北 芳博	科学技術振興事業団	CREST研究員	ホスホリパーゼA ₂	平成10年12月～平成15年11月
金 然正	科学技術振興事業団	CREST研究員	トランスポーター	平成14年 4月～平成15年 3月
井出 義之	東大医	大学院生	酵素細胞内移行	平成10年12月～平成15年11月
臼井 洋	東大医	大学院生	神経GPCR	平成12年 4月～平成15年11月
小笠原英明	東大医	大学院生	KIDS cPLA ₂	平成10年12月～平成15年 3月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
小林 玲奈	東大医	大学院生	フェロモン受容体	平成13年 4月～ 平成15年11月
吉川 圭介	東大医	大学院生	kids cPLA ₂	平成13年 4月～ 平成15年11月
寺脇 幹	東大医	大学院生	受容体欠損マウス	平成11年 4月～ 平成15年 3月
木村 昌史	東大医	大学院生	発生工学	平成12年 4月～ 平成15年11月
飯塚 佳子	東大医	大学院生	受容体欠損マウス	平成11年12月～ 平成15年11月
野口 饗子	東大医	大学院生	LPA受容体	平成14年 6月～ 平成15年11月
野村弘一郎	東大医	大学院生	ホスホリパーゼA ₂	平成15年 4月～ 平成15年11月
加藤 晴康	東大医	大学院生	ロイコトリエン受容体	平成15年 4月～ 平成15年11月
大戸 貴代	東大医	大学院生	ホスホリパーゼA ₂	平成15年 4月～ 平成15年11月
木原 泰之	東大医	大学院生	PAF受容体	平成15年 4月～ 平成15年11月
国枝加奈子	東大医	大学院生	GPCR	平成15年 4月～ 平成15年11月
平林 哲也	東大医	学振PD	脳GPCRの研究	平成10年12月～ 平成14年 3月
奥野 利明	東大医	助手	GPCR	平成13年 4月～ 平成15年11月
星野 明美	科学技術振興事業団	CREST研究 補助員		平成13年12月～ 平成15年 1月
松本 康代	科学技術振興事業団	CREST技術員		平成10年12月～ 平成15年11月
大井川直子	科学技術振興事業団	CREST研究 チーム事務員		平成10年12月～ 平成15年11月

② 脂質生化学グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
和泉 孝志	群大医	教授	研究グループの総括	平成10年12月～ 平成15年11月
杉本 博之	群大医	助教授	リン脂質代謝	平成14年 4月～ 平成15年11月
立井 一明	群大医	講師	ショウジョウバエと ホスホリパーゼD	平成14年 4月～ 平成15年11月
大日 方英	群大医	助手	リガンドスクリーニング	平成11年 4月～ 平成15年11月
花香 博美	群大医	助手	酵素制御	平成10年12月～ 平成15年11月
中根 慎治	群大医	ポスドク	脂質の抽出と分析	平成14年 4月～ 平成15年11月

③ 電気生理学グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
渋谷 克栄	新潟大脳研究施設	教授	変異マウスの解析	平成10年12月～ 平成15年11月
加藤 邦夫	高知大学医	助教授	変異マウスの解析	平成13年 4月～ 平成15年11月

④ 脳形態学グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
佐藤 衛	愛知県コロニー	研究員	変異マウスの解析	平成14年 4月～ 平成15年11月
岸川 正大	愛知県コロニー	部長	変異マウスの解析	
島田 厚良	愛知県コロニー	室長	変異マウスの解析	平成14年 4月

⑤ 創薬グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
赤松 穰	明治製菓 薬品総合研究所	所長	創薬グループの総括	平成10年12月～ 平成14年 3月
大澤 福一	明治製菓 薬品総合研究所	主任研究員	阻害剤、拮抗剤開発	平成10年12月～ 平成15年11月
星子 繁	明治製菓 薬品総合研究所	所長	阻害剤、拮抗薬開発	平成14年 4月～ 平成15年11月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2002. 9.24-9.28	国際PAF学会 脂質メディエーターの 脳機能	早稲田国際会館	600	シンポジウムを主催
2001. 9.26-28	日本神経科学会	京都国際会議場	100	合同開催（神経科学、 神経化学）でのシンポ ジウム組織

(2) 招聘した研究者等

氏名（所属・役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Jerold Chun（米国） ソーク研究所神経生物学	研究の打ち合わせおよ び討論	東京大学医学部	2001. 9.21-10.1

6. 主な研究成果、発表等

(1) 論文発表 (国内 1件、海外 65件)

(英語論文)

1. T. Hirabayashi, K. Kume, K. Hirose, T. Yokomizo, M. Iino, H. Itoh and T. Shimizu
Critical Duration of Intracellular Ca^{2+} Response Required for Continuous Translocation
and Activation of Cytosolic Phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* **274**, 5163-5169, (1999)
2. Masuda, K, Yokomizo, T, Izumi, T, Shimizu, T cDNA cloning and characterization of
guinea-pig leukotriene B4 receptor. *Biochem. J.* **342**, 79-85 (1999)
3. Toda, A, Yokomizo, T, Masuda, K, Nakao, A, Izumi, T, and Shimizu, T., Cloning and
characterization of rat leukotriene B4 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**,
806-812 (1999)
4. Hirabayashi, T., and Shimizu, T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase
 A_2 . *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 124-138 (2000)
5. Takaku, K, Sonoshita, M., Sasaki, N., Uozumi, N., Doi, Y., Shimizu, T., and Taketo,
M.M. Suppression of intestinal polyposis in Apc-716 knockout mice by an additional mu-
tation in the cytosolic phospholipase A_2 gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 34013-34016 (2000)
6. Kawasawa, Y., Kume, K., Nakade, S., Haga, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Brain-
specific expression of novel G-protein-coupled receptors , with homologies to Xenopus
PSP24 and human GPR45. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 960-964 (2000).
7. Kawasawa, Y., Kume, K., Izumi, T., and Shimizu, T. Mammalian PSP24s are not respon-
sible to lysophosphatidic acid in mammalian expression systems. *Biochem. Biophys.
Res. Commun.* **276**, 952-959 (2000).
8. Nakatani, N., Uozumi, N., Kume, K., Murakami, M., Kudo, I., and Shimizu, T. Role of
cytosolic phospholipase A_2 in lipid mediator productions and histamine release in mouse

- bone marrow-derived mast cells. *Biochem. J.* **352**, 311-317(2000).
9. Kato, K., Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Cell-specific transcriptional regulation of human leukotriene B4 receptor gene. *J. Exp. Med.* **192**, 413-420 (2000).
 10. Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T., and Shimizu, T. A second leukotriene B4 receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* **192**, 421-432 (2000)
 11. Shindou, H., Ishii, S., Uozumi, N., and Shimizu, T. Roles of Cytosolic Phospholipase A₂ and Platelet-Activating Factor Receptor in the Ca-Induced Biosynthesis of PAF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 812-817 (2000)
 12. Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kume, K., Izumi, T., Ouchi, Y., and Shimizu, T. Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role of cytosolic phospholipase A₂. *Nature Immunol.* **1**, 42-46, (2000)
 13. Ishii, S, and Shimizu, T.: Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. (Review) *Prog. Lipid Res.* **39**, 41-82, (2000)
 14. Yokomizo,T., Masuda,K., Kato, K, Toda, A., Izumi, T., and Shimizu, T. Leukotriene B4 Receptor; cloning and intracellular signaling. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **161**, S51-S55 (2000)
 15. Aihara, M., Ishii, S., Kume, K., and Shimizu, T. Interaction between neuron and glia mediated by platelet-activating factor. *Genes to Cells* **5** (5) 397-406 (2000)
 16. Tabuchi, S., Kume, K., Aihara, M., and Shimizu, T. Expression of lysophosphatidic acid receptor in rat astrocytes: Mitogenic effect and expression of neurotrophic genes. *Neurochem. Res.* **25**, 573-582 (2000)
 17. Noiri, E., Yokomizo, T., Nakao, A., Izumi, T., Fujita, T., Kimura, S., and Shimizu, T. A novel in vivo approach showing the chemotactic activity of leukotriene B4 in acute

- ischemic-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 823-828 (2000)
18. Tabuchi, S., Kume, K., Aihara, M., and Shimizu, T. Expression of lysophosphatidic acid receptor in rat astrocytes: Mitogenic effect and expression of neurotrophic genes. *Neurochem. Res.* **25**, 573-582 (2000)
 19. Shimizu, T. Biological control by lipid mediators and pathophysiology. *Jap. Med. Assoc. J.* **44**, 369-374. (2001)
 20. Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Co-expression of two LTB₄ receptors in human mononuclear cells. *Life Sci.* **68**, 2207-2212 (2001)
 21. Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T. Leukotriene B₄:metabolism and signal transduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**, 231-241 (2001)
 22. Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low-affinity leukotriene B₄ receptor, BLT₂. *J. Biol. Chem.* **276**, 12454-12459 (2001)
 23. Yamamoto, T., Yokomizo, T., Nakao, A., Izumi, T., and Shimizu, T. Immunohistochemical localization of guinea-pig leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-ketoprostaglandin 13-reductase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6105-6113, (2001)
 24. Yamashita, A., Kawagishi, N., Miyashita, T., Nagatsuka, T., Sugiura, T., Kume, K., Shimizu, T., and Waku, K. ATP-independent fatty acyl-coenzyme A synthesis from phospholipid: coenzyme A-dependent transacylation activity toward lysophosphatidic acid catalyzed by acyl-coenzyme A:lysophosphatidic acid acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**, 26745-26752, (2001)
 25. Fukunaga, K., Ishii, S., Asano, K., Yokomizo, T., Shiomi, T., Shimizu, T., and Yamaguchi, K. Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 43025-43030, (2001)

26. Wu, C., Stojanov, T., Chami, O., Ishii, S., Shimizu, T., Li, A., and O'Neill, C. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **276**, 26962-26968, (2001)
27. Mizuno, S., Izumi, T., and Isaji, S.: Role of PAF in acute liver injury after extended hepatectomy: Overexpression of PAF receptor mRNA on Kupffer cells. *Digestive Dis. Sci.*, **46**: 1299-1304 (2001)
28. Sugimoto, H., Bakovic, M., Yamashita, S., and Vance, D.E.: Identification of transcriptional enhancer factor-4 as a transcriptional modulator of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase alpha. *J. Biol. Chem.*, **276**: 12338-12344. (2001)
29. Ohshima, N., Ishii, S., Izumi, T., and Shimizu, T. Receptor-dependent metabolism of platelet-activating factor in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **277**, 9722-9727, (2002)
30. Hanaka, H., Shimizu, T., and Izumi, T. Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase. *Biochem. J.* **361**, 505-514, (2002)
31. Ogasawara, H., Ishii, S., Yokomizo, T., Kakinuma, T., Komine, M., Tamaki, K., Shimizu, T., and Izumi, T. Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors, mCysLT₁ and mCysLT₂: Differential pharmacological properties and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* **277**, p18763-18768, (2002)
32. Soares, A.C., Pinho, V.S., Souza, D.G., Shimizu, T., Ishii, S., Nicoli, J.R., and Teixeira, M.M. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. *Brit. J. Pharmacol.* **137**, 621-628, (2002)
33. Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kita, Y., Yamamoto, H., Ohga, E., Ouchi, Y., and Shimizu, T. A pivotal role of cytosolic phospholipase A₂ in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nature Med.* **8**, p480-484, (2002)
34. Uozumi, N., Shimizu, T. Roles for cytosolic phospholipase A₂alpha as revealed by gene-

- targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**: 59-69, (2002)
35. Toda A, Yokomizo T, Shimizu T. Leukotriene B4 receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**:575-85, (2002)
 36. Ishii, S., Nagase, T., and Shimizu, T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**, 599-609, (2002)
 37. Ito, N., Yokomizo, T., Sasaki, T., Kurosu, H., Penninger, J., Kanaho, Y., Katada, T., Hanaoka, K., and Shimizu, T. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-activation and Ca influx for leukotriene B4-induced enzyme release. *J. Biol. Chem.* **277**, 44898-44904, (2002)
 38. Wong, D.A., Uozumi, N., Kita, Y., and Shimizu, T. Discrete role for cytosolic phospholipase A2-alpha in platelets: Studies using single and double mutant mice of cytosolic and group IIA-secretory phospholipase A2. *J. Exp. Med.* **196**,349-57, (2002)
 39. Izumi, T., Yokomizo, T., Obinata, H., Ogasawara, H., Shimizu, T. Leukotriene receptors: classification, gene expression, and signal transduction. *J. Biochem.* **132**,1-6, (2002)
 40. Honda, Z., Ishii, S., and Shimizu, T. Platelet-activating factor receptor. *J. Biochem.* **131**,773-779, (2002)
 41. Takizawa, T., Kato, M., Kimura, H., Suzuki, M., Tachibana, A., Obinata, H., Izumi, T., Tokuyama, K., and Morikawa, A.: Inhibition of protein kinase A and C demonstrates dual modes of response in human eosinophils stimulated by platelet-activating factor. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **110**: 241-248 (2002)
 42. Obinata, H., Yokomizo, T., Shimizu, T. and Izumi, T. Glucocorticoids up-regulate leukotriene B4 receptor-1 expression during neutrophilic differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 114-9, (2003)
 43. Okuno, T., Ago, H., Terawaki, K, Miyano, M., Shimizu, T. and Yokomizo T. Helix 8 of

- the leukotriene B4 receptor is required for the conformational change to the low-affinity state after G-protein activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 41500-41509, (2003)
44. Vogensen, S.B., Stromgaard, K., Shindou, H., Jaracz, S., Suehiro, M., Ishii, S., Shimizu, T., and Nakanishi, K. Preparation of 7-substituted ginkgolide derivatives: potent platelet-activating factor (PAF) receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **46**, 601-608, (2003)
45. Weijer, S., Leemans, J. C., Florquin, S., Shimizu, T., Ishii, S., and Van Der Poll, T. Host response of platelet-activating factor receptor-deficient mice during pulmonary tuberculosis. *Immunology*, **109**, 552-556, (2003)
46. Souza, D. G., Pinho, V., Soares, A. C. Shimizu, T., Ishii, S., and Teixeira, M. M. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Brit. J. Pharmacol.* **139**, 733-740, (2003)
47. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kta, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki T., Uchida, S., Takenawa, S., Waki H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423**, 762-768, (2003)
48. Talvani, A., Santana, G., Barcelos, L. S., Ishii, S., Shimizu, T., Romanha, J., Silva, J. S., Soares, M. B. P. and Teixeira, M. M. Experimental Trypanosoma cruzi infection in platelet-activating factor -deficient mice. *Microb. Infect.* **5**, 789-796, (2003)
49. Wong, D. A., Uozumi, N., Kita, Y., and Shimizu, T. Cytosolic phospholipase A2a in mouse platelets: Clinical andtherapeutic implications. Advances in Prostaglandin, Leukotriene and Other Bioactive Lipid Research. (Yazici, Z. Folco,G. C., Drazen, J. M., Niigam, S., and Shimizu, T. eds) pp 81-86, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. :ISBN: 0306477637, (2003)
50. Shimizu, T., Yokomizo, T., and Izumi, T. Characterization of two distinct types of

- leukotriene B4 receptors. *Oxygen and Life: Oxygenases, Oxidase, and Lipid Mediators* (Ishimura, Y., Nozaki, M., Yamamoto, S., Shimizu, T., Narumiya, S., and Mitani, F. eds) pp 415-420, Elsevier, Amsterdam. :ISBN: 0444508724, (2003)
51. Tokuoka, S. M., Ishii, S., Kawamura, N., Satoh, M., Shimada, A., Sasaki, S., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A., and Shimizu, T. Involvement of Platelet-Activating Factor and LIS1 in Neuronal Migration. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 563-570, (2003)
 52. Masuda, K., Itoh, H., Sakihama, T., Akiyama, C., Takahashi, K., Fukuda, R. Yokomizo, T., Shimizu, T., Kodama, T., and Hamakubo, T. A combinatorial G protein-coupled receptor reconstitution system on budded baculovirus: Evidence for Gai and Gao coupling to a human leukotriene B4 receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 24552-24562, (2003)
 53. Noguchi, K., Ishii, S., and Shimizu, T. Identification of p2y9/GPR23 as a Novel G Protein-Coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, Structurally Distant from the Edg Family *J. Biol. Chem.* **278**, 25600-25606, (2003)
 54. Hegen, M., Sun L., Uozumi N., Kume K., Goad, E.M., Nickerson-Nutter L.C., Shimizu T., and Clark D.J. Cytosolic Phospholipase A2a deficient Mice Are Resistant to Collagen-induced Arthritis. *J. Exp. Med.* **197**, 1297-1302, (2003)
 55. Miyaura, C., Inada, M., Matsumoto, C., Ohshiba, C., Uozumi, N., Shimizu, T., and Ito, A. An Essential Role of Cytosolic Phospholipase A₂a in Prostaglandin E₂-mediated Bone Resorption Associated with Inflammation *J. Exp. Med.* **197**, 1303-1310, (2003)
 56. Omura, M., Sekine, H., Shimizu, T., Kataoka, H, and Touhara, K. In situ Ca imaging of odor responses in a coronal olfactory epithelium slice *Neuroreport* **14**, 1123-7, (2003)
 57. Asai, K, Hirabayashi, T, Houjou, T, Uozumi, N., Taguchi, R., and Shimizu, T. Human Group IVC phospholipase A₂ (cPLA₂): roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 8909-8914, (2003)
 58. Nagase T., Uozumi N., Aoki-Nagase T., Terawaki K., Ishii S., Tomita T., Yamamoto H.,

- Hashizume K., Ouchi Y., Shimizu T. A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A₂, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. *Am J Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **284**, L720-L726, (2003)
59. Usui, H., Taniguchi, M., Yokomizo, T., and Shimizu, T. Interaction of plexin A1 and plexin B1 at the cytoplasmic domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**,927-31, (2003)
60. Brink, C., Dahle'n, S.K., Drazen, J., Evans, J.F., Hay, D.W.P., Nicosia, S., Serhan, C.N., Shimizu, T., and Yokomizo, T. Classification of Leukotriene and Lipoxin Receptors: Distribution, Function and Molecular Aspects. *Pharmacol. Rev.* **55**,195-227, (2003)
61. Taniguchi, M., Nagao, H., Takahashi Y.K., Yamaguchi, M., Mitsui, S., Yagi, T., Mori, K. and Shimizu, T. Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice. *J. Neurosci.* **23**,1390-1397, (2003)
62. Suzuki, M., Kato, M., Hanaka, H., Izumi, T., and Morikawa, A.: Actin assembly is a crucial factor for superoxide anion generation from adherent human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **112**: 126-133 (2003)
63. Sugimoto, H., Sugimoto, S., Tatei, K., Obinata, H., Bakovic, M., Izumi, T*, and Vance, D.E.* (* equal contribution, corresponding authors): Identification of Ets-1 as an important transcriptional activator of CTP: phosphocholine cytidyltransferase alpha in COS-7 cells and co-activation with transcriptional enhancer factor-4. *J. Biol. Chem.*, **278**: 19716-19722 (2003)
64. Taniguchi, T. and Shimizu, T. Characterization of a novel member of murine semaphorin family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press) (2003)
65. A. Shimada, M. Satoh, M. Hosokawa, N. Kawamura, A. Kashiwai, H. Keino, Y. Chiba and T. Shimizu. Highly selective localization of leukotriene C₄ synthase in brain hypothalamic and extrahypothalamic vasopressin systems. (in press)

(和文論文)

1. 横溝岳彦. ロイコトリエンB4の代謝と受容体. 生化学. 74, p1139-1147 (2002)
2. 水孝雄. 生理活性脂質受容体. 実験医学「受容体がわかる」p.114-122 (2003)

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 25件、海外 25件)

(海外)

1. Shimizu, T. Lipid mediators: biosynthesis and receptors. Plenary lecture, Keystone symposium, Keystone, 1999年4月
2. Shimizu, T., Uozumi, N., Nakatani, N., Hirabayashi, T., and Kume, K. Role of cytosolic phospholipase A₂ in vivo and in vitro. 6th International Conference on Eicosanoids and Lipid Mediators. Boston, 1999年9月
3. Shimizu, T. Izumi, T. and Yokomizo, T., Leukotriene B4 receptors: from clones to clinics, 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications Florence, 2000年6月4-8日
4. Yokomizo, T., Noiri, E., Kato, K., Masuda, K., Toda, A., Ito, N., Izumi, T., and Shimizu, T. Structures and Functions of Leukotriene B4 receptors. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, Florence, 2000年6月4-8日
5. Ishii, S., Nagase, T., and Shimizu, T. CRITICAL ROLES OF PAF RECEPTOR AND (cPLA₂ IN ACUTE LUNG INJURY. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, Florence, 2000年6月4-8日
6. Shimizu, T. Roles of (cPLA₂ and related molecules in vivo. FASEB Phospholipases Summer Research Conference, Snowmass, Colorado, 2000年7月8-13日
7. Shimizu, T., Yokomizo, T., and Izumi, T. Characterization of two forms of leukotriene B4 receptors. The 3rd International Conference on Oxygenases Kyoto, 2000年11月

8. Yokomizo, T., Izumi, T., and Shimizu, T., Regulation and Signaling of Leukotriene Receptors. Keystone symposium, アメリカ合衆国ユタ州Snowbird, 2001年4月8日
9. T. YOKOMIZO and T. SHIMIZU. BLT1 AND BLT2, DISTINCT LEUKOTRIENE B4 RECEPTORS. 第7回血小板活性化因子と脂質メディエーターに関する国際会議, 東京, 2001年9月24日-9月27日
10. Iizuka, Y, Yokomizo, T, Hagiya, H, Toda, A, Terawaki, K, and Shimizu, T. Cloning and characterization of a murine second leukotriene B4 receptor. BLT2.第7回血小板活性化因子と脂質メディエーターに関する国際会議, 東京, 2001年9月24日-9月27日
11. S. ISHII and T. SHIMIZU A TRANSGENIC APPROACH FOR UNDERSTANDING ROLES OF PAF RECEPTOR IN VIVO. 第7回血小板活性化因子と脂質メディエーターに関する国際会議, 東京, 2001年9月24日-9月27日
12. 魚住尚紀, 清水孝雄 ROLES OF CYTOSOLIC PHOSPHOLIPASE A₂ IN VIVO. 第7回血小板活性化因子と脂質メディエーターに関する国際会議, 東京, 2001年9月24日-9月27日
13. 大嶋紀安, 石井聡, 和泉孝志, 清水孝雄. Receptor-Dependent Metabolism of PAF by Macrophages. 第7回血小板活性化因子と脂質メディエーターに関する国際会議, 東京, 2001年9月24日-9月27日
14. Takao Shimizu. Cytosolic phospholipase A₂ and related molecules (Plenary lecture). 12th International Conference on ADVANCES IN PROSTAGRADIN, LEUKOTRIENE AND OTHER BIOACTIVE LIPID RESERCH Basic Science and Clinical Applications, トルコ・イスタンブール, 2002年8月26日
15. 石井聡、魚住尚紀、清水孝雄、長瀬隆英、大内尉義、ブレオマイシン誘導肺繊維症における (cPLA₂とPAF受容体の役割12th International Conference on ADVANCES IN PROSTAGRADIN, LEUKOTRIENE AND OTHER BIOACTIVE LIPID RESERCH Basic Science and Clinical Applications, トルコ・イスタンブール, 2002年8月26日

16. Yoshiko Iizuka, Takehiko Yokomizo, Hiroshi Hagiya, Akiko Toda, Kan Terawaki^{1, 2}, Satoshi Ishii, and Takao Shimizu, CHARACTERIZATION OF A MOUSE SECOND LEUKOTRIENE B₄ RECEPTOR, mBLT2. 12th International Conference on ADVANCES IN PROSTAGLANDIN, LEUKOTRIENE AND OTHER BIOACTIVE LIPID RESEARCH Basic Science and Clinical Applications ,トルコ・イスタンブール, 2002年8月26日
17. Takao Shimizu. Roles of cytosolic phospholipase A₂ α in vivo. 2002 FASEB Summer Research Conference on Phospholipases, Tuscon, AZ June 28-July 3, 2002,
18. Takao Shimizu, and Naonori Uozumi. Roles of cytosolic phospholipase A₂ in vivo. International Symposium on Recent Biomedical Advances in Eicosanoid Research., Berlin, August 22-24, 2002,
19. Izumi, T., Current topics on leukotriene research., The 12th Congress of Interasma Japan/ North Asia, Saitama, Japan, 2002,
20. Tatei, K. and Izumi, T., Overexpression of the Phospholipase D gene in *Drosophila*., First COE International Symposium, Gunma University, Maebashi, Gunma, 2003,
21. Takao Shimizu. Roles of cytosolic phospholipase A₂ and related molecules in vivo. Keystone symposia 2003, Eicosanoid lipid mediators:from molecular discovery to clinical applications. Tahoe City, California, 2003年3月11-16日
22. Satoshi Ishii, Kyoko Noguchi, and Takao Shimizu. A novel receptor (LPA₄) for lysophosphatidic acid. FASEB Summer Research Conferences; Lysophospholipids and related lipids in biology and diseases ,Snowmass, Colorado, USA, 2003年6月28日-7月3日
23. Yokomizo T, Terawaki K, Shimizu T:Leukotriene B₄ receptors: Cloning, Pharmacology, and Functions in vivo, 6th World Congress on Inflammation, Vancouver, 2003年7月
24. M. Taniguchi, H. Nagao, Y.K. Takahashi, S. Mitsui, M. Yamaguchi, T. Yagi, K. Mori

and T. Shimizu. Semaphorin 3A is required for formation of olfactory sensory map. New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach, Okinawa, 2003年10月16-18日

25. Yokomizo T, Shimizu T: In vitro and in vivo roles of leukotriene B4 receptors, Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology, アメリカ合衆国・Taos, 2004年2月20日

(国内)

1. 加藤和彦, 横溝岳彦, 和泉孝志, 清水孝雄. ヒトロイコトリエンB4受容体遺伝子の転写機構の解析. 第22回日本分子生物学会年会, 博多, 1999.12.
2. 川沢百可, 桑和彦, 和泉孝志, 中出真嗣, 芳賀久典, 清水孝雄. 脳神経特異的な新規Gタンパク共約型受容体の遺伝子クローニング. 第22回日本分子生物学会年会, 博多, 1999.12.
3. 小笠原英明, 平林哲也, 和泉孝志, 清水孝雄. マウスのロイコトリエンD4受容体のクローニングと発現. 第42回日本脂質生化学研究会, 北九州市, 2000年6月16-17日
4. 進藤英雄, 石井聡, 魚住尚紀, 清水孝雄. cPLA₂ノックアウトマウスとPAF受容体ノックアウトマウスの腹腔滲出細胞におけるPAF産生能. 第42回日本脂質生化学研究会, 北九州市, 2000年6月16-17日
5. 和泉孝志, 横溝岳彦, 清水孝雄. ロイコトリエンの産生制御と受容体. 第53回日本細胞生物学会, 福岡, 2000年10月31日-11月2日
6. 横溝岳彦. 二つのロイコトリエンB4 (LTB₄) 受容体の構造と機能. 第78回日本生理学会, 京都, 2001年3月29日-31日
7. 横溝岳彦, 加藤和彦, 和泉孝志, 清水孝雄. 第二のロイコトリエンB4受容体BLT2のクローニングと解析. 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
8. Dennis A Wong, 北芳博, 魚住尚紀, 清水孝雄. The role of cytosolic phospholipase A₂

in platelets. 日本脂質生化学研究会, 北海道帯広市, 2001年6月21-22日

9. 和泉孝志, 花香博美, 清水孝雄. 5-リポキシゲナーゼの細胞内局在と移行. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
10. 北芳博, 魚住尚紀, 清水孝雄. 細胞質型ホスホリパーゼA₂ α (cPLA₂ α) の女性生殖系における役割. 第44回日本脂質生化学研究会, 東京, 2002年6月14日
11. 魚住尚紀, 長瀬隆英, 石井 聡, 北芳博, 山本寛, 大賀栄次郎, 大内尉義, 清水孝雄. 細胞質型ホスホリパーゼA₂ α (cPLA₂ α) のブレオマイシン肺炎における役割, 第44回日本脂質生化学研究会, 東京, 2002年6月14日
12. 奥野利明, 横溝岳彦, 清水孝雄. ロイコトリエンB₄受容体のリガンド親和性を制御する細胞内C末端の役割. 第5回東京プロスタノイド研究会, 東京, 2002年6月22日
13. 谷口雅彦. 匂い地図形成におけるセマフォリンの機能. 第13回高次脳機能障害シンポジウム, 東京, 2002年10月25日
14. 立井一明, 山下哲 and 和泉孝志 (2002.06.14-15). キイロショウジョウバエのホスホリパーゼD遺伝子の単離と解析. 第44回日本脂質生化学研究会研究集会, 早稲田, 東京, 2002.
15. 和泉孝志. 生理活性脂質と気管支喘息. 栃木喘息シンポジウム, 宇都宮, 2002.
16. 中根慎治, 和泉孝志. 生理活性脂質LPAの分析法に関する研究. 第49回北関東医学会総会, 前橋, 2002.
17. 和泉孝志. 生理活性脂質の基礎と臨床. 第49回北関東医学会総会, 前橋, 2002.
18. 横溝岳彦, 清水孝雄. ロイコトリエンB₄の二つの受容体の同定と生体内での役割の解明. 第18回本郷呼吸器研究会, 東京, 2003年2月18日
19. 野口響子, 石井聡, 清水孝雄. 新たなLPA受容体の同定. 第7回東京プロスタノイド

研究会, 東京, 2003年5月17日

20. 谷口雅彦, 清水孝雄. 新規セマフォリン分子のクローニング. 第36回日本発生生物学会, 札幌, 2003年6月11-13日
21. 小池太吾, 武田茂樹, 大日方英, 和泉孝志. 5-oxo-EET受容体の活性化が引き起こすケモタキシスと細胞内セカンドメッセンジャー濃度変化の測定. 第45回日本脂質生化学会, 仙台, 2003.
22. 大日方英, 横溝岳彦, 清水孝雄, 和泉孝志. ロイコトリエンB₄受容体-1のグルコシルチコイドによる発現および機能の亢進. 第5回東京プロスタノイド研究会, 東京, 2002年6月22日
23. 野口響子, 石井聡, 清水孝雄. Identification of a Novel Lysophosphatidic Acid Receptor, p2y₉/GPR23. 第76回日本生化学会, 横浜, 2003年10月15-18日
24. 横溝岳彦. ロイコトリエンB₄受容体BLT1の生体内での機能. 第24回日本炎症・再生医学会ワークショップ, 京都, 2003年11月26-27日
25. Yokomizo, T., Shimizu, T.: Reduced airway hyperreactivity, eosinophil acculation, and IgE production in leukotriene B₄ receptor 1-null mice. 第33回日本免疫学会・学術集会シンポジウム, 福岡, 2003年12月8-10日

② ポスター発表（国内 40件、海外 26件）

(海外)

1. Obinata, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Rapid activation of HepG2 cells by 17 β -estradiol. FASEB Summer Research Conference "Membrane steroid receptors" Copper Mountain, Colorado, 1999年8月
2. Tokuoka-Mitamura, S. Ishii, S. and Shimizu, T. Neuronal migration in PAF receptor-deficient mice. The Society for Neuroscience, 30th Annual Meeting, New Orleans, 2000年11月4-9日

3. H. Sekine, H., Ishii, S., K. Kume, K., M. Taniguchi, M., A. Hatanaka, A. K. Touhara, K. and Shimizu, T. Functional Cloning of Olfactory Receptor for Fatty Acid Derivatives. The Society for Neuroscience, 30th Annual Meeting, New Orleans, 2000年11月4-9日
4. Ogasawara, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Cloning and expression of leukotriene D4 receptor. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, Florence, 2000年6月4-8日
5. Kato, K., Yokomizo, T. Izumi, T. and Shimizu, T. Transcriptional mechanism of human leukotriene B4 receptor. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, Florence, 2000年6月4-8日
6. Toda, A. T. Yokomizo, T. Masuda, K., Nakao, A., Izumi, T. and Shimizu, T. Cloning and characterization of rat leukotriene B4 receptor. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, Florence, 2000年6月4-8日
7. Hirabayashi, T., Ogasawara, H., Izumi, T., and Shimizu, T. Leukotriene D4 Activates Microglia through the CysLT1 Receptor. 11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research: Basic Science and New Clinical Applications, Florence, 2000年6月4-8日
8. Uozumi, N., Shimizu, T. Molecular cloning of murine cytosolic phospholipase $A_2 \alpha$. FASEB Phospholipases Summer Research Conference, Snowmass, Colorado, 2000年07月08-13日
9. Hanaka, H., Shimizu, T., and Izumi, T. Translocation and localization of 5-lipoxygenase. The 3rd International Conference on Oxygenases, Kyoto, 2000年11月
10. H. OBINATA, T. YOKOMIZO, T. SHIMIZU and T. IZUMI Glucocorticoid Up-Regulates Leukotriene B4 Receptor Expression in HL-60 Cells Differentiated into Neutrophils. 第7回血小板活性化因子と脂質メディエーターに関する国際会議,

東京 2001年9月24日-9月27日

11. S.M. Tokuoka, S. Ishii, A. Shimada, T. Shimizu. PLATELET-ACTIVATING FACTOR AND ITS RECEPTOR ON NEURONAL MIGRATION. 第7回血小板活性化因子と脂質メディエーターに関する国際会議, 東京, 2001年9月24日-9月27日
12. Tetsuya HIRABAYASHI, K. Kishimoto and Takao SHIMIZU. Cysteinyl leukotrienes activate microglia through the CysLT1 receptor. 第7回血小板活性化因子と脂質メディエーターに関する国際会議, 東京, 2001年9月24日-9月27日
13. K. Kishimoto, J. Shirakawa, N. Uozumi, T. Izumi, H. Kuroyanagi, Y. Suzuki, T. Shirasawa, K. Nakadate, Y. Watanabe, and T. Shimizu. A STIMULUS-DEPENDENT, DENTATE GYRUS-SPECIFIC NOVEL PHOSPHOLIPASE A2. 31th Annual Meeting Society For Neuroscience, アメリカ合衆国カリフォルニア州San Diego, 2001年11月10-15日
14. Motoyasu Satou and Takao SHIMIZU. Cellular responses of vomeronasal and accessory olfactory neurons evoked by urine-derived compounds. 31th Annual Meeting Society For Neuroscience, アメリカ合衆国カリフォルニア州San Diego, 2001年11月10-15日
15. M. Taniguchi, H. Nagao, Y.K. Takahashi, S. Mitsui, M. Yamaguchi, T. Yagi, K. Mori and T. Shimizu. Distorted sensory maps in the olfactory bulb of Semaphorin 3A deficient mice. 31th Annual Meeting Society For Neuroscience, アメリカ合衆国カリフォルニア州San Diego, 2001年11月10-15日
16. Suzumi. Tokuoka-Mitamura, Satoshi Ishii, and Takao SHIMIZU. NEURONAL MIGRATION IN PAF RECEPTOR-DEFICIENT MOUSE. 31th Annual Meeting Society For Neuroscience, アメリカ合衆国カリフォルニア州San Diego, 2001年11月10-15日
17. Tetsuya HIRABAYASHI, Hideaki OGASAWARA, Takashi IZUMI, Shin-ichi KOHSAKA and Takao SHIMIZU. Cysteinyl leukotrienes activate microglia through the CysLT1 receptor. 31th Annual Meeting Society For Neuroscience, アメリカ合衆国カ

リフォルニア州San Diego, 2001年11月10-15日

18. Sugimoto, H., Iijima, T., Nakane, S., and Izumi, T., Characterization of lysophospholipase D activity in rat brain., Seventh International Congress on Platelet-Activating Factor and Lipid Mediators, Tokyo, Japan, 2001
19. Yoshihiro Kita, Naonori Uozumi and Takao Shimizu, Role of Cytosolic Phospholipase $A_2 \alpha$ in Early Pregnancy. 2002 FASEB Summer Research Conferences Phospholipases アメリカ合衆国, アリゾナ州, ツーソン, 2002年6月29-7月30日
20. Naonori Uozumi, Takahide Nagase, Satoshi Ishii, Yoshihiro Kita, Hiroshi Yamamoto, Eijiro Ohga, Yasuyoshi Ouchi, and Takao Shimizu, Cytosolic phospholipase $A_2 \alpha$ plays a pivotal role in bleomycin-induced pulmonary fibrosis, 2002 FASEB Summer Research Conferences Phospholipases, アメリカ合衆国, アリゾナ州, ツーソン, 2002年6月29-7月30日
21. Toshiaki Okuno, Takehiko Yokomizo, Takao Shimizu, ROLE OF THE CYTOPLASMIC TAIL OF BLT1 RECEPTOR, 12th International Conference on ADVANCES IN PROSTAGRADIN, LEUKOTRIENE AND OTHER BIOACTIVE LIPID RESERCH Basic Science and Clinical Applications, トルコ・イスタンブール, 2002年8月26日
22. 平林哲也, 清水孝雄, ACTIVATION OF MICROGLIAL CELLS BY LEUKOTRIENE D4, 12th International Conference on ADVANCES IN PROSTAGRADIN, LEUKOTRIENE AND OTHER BIOACTIVE LIPID RESERCH Basic Science and Clinical Applications, トルコ・イスタンブール, 2002年8月26日
23. A. Toda, T.Yokomizo. N. Uozumi, and T.Shimizu Roles of cytosolic phospholipase A_2 -alpha in immunological response. Keystone symposia: Cell Biology of the Immune Response, アメリカ合衆国・Keystone, 2003年3月5-10日
24. Kyoko Noguchi, Satoshi Ishii and Takao Shimizu. Identification of a Novel G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, p2y9/GPR23. FASEB Summer Research Conferences-Lysophospholipids and Related lipids in Biology and Diseases-, Snowmass,

Colorado, USA, 2003年6月28日-7月3日

- 25 K. Kishimoto, K. Nakadate, T. Shirasawa, T. Izumi, N. Uozumi, Y. Watanabe and T. Shimizu. Characterization of kainate-inducible dentate gyrus-specific cytosolic phospholipase A₂ (KIDScPLA₂). 33th Annual Meeting Society For Neuroscience, アメリカ合衆国・New Orleans, 2003年11月12-16日
26. M. Taniguchi and T. Shimizu. Identification and cloning of a novel member of murine semaphorin family. 33th Annual Meeting Society For Neuroscience, アメリカ合衆国・New Orleans, 2003年11月8-12日

(国内)

1. 関根寿樹, 東原和成, 清水孝雄. みどりの香りの嗅覚受容体の機能的クローニング. 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
2. 平林哲也, 小笠原英明, 和泉孝志, 清水孝雄. ロイコトリエンD₄受容体を介したミクログリアの活性化. 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
3. 石井聡, 長瀬俊秀, 清水孝雄. 気管支喘息における血小板活性化因子 (PAF) の役割. 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
4. 岸本幸治, 魚住尚紀, 和泉孝志, 清水孝雄, 黒柳秀人, 鈴木陽一, 白澤卓二, 中舘和彦, 渡辺恭良. (2000). 刺激依存性・海馬歯状回特異的新規ホスホリパーゼA₂アイソフォーム, 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
5. 和泉孝志, 横溝岳彦, 加藤和彦, 小笠原英明, 平林哲也, 清水孝雄. ロイコトリン受容体. 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
6. 魚住尚紀, 清水孝雄. マウス細胞質型ホスホリパーゼA₂βのクローニング. 第73回日本生化学会, 横浜. 2000年10月11-14日
7. Yoshiyuki Ide, Takehiko Yokomizo, Takashi Izumi, Takao Shimizu The mechanism of intracellular localization of LTA₄H. 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日

8. Suzumi M. Tokuoka, ○Satoshi Ishii, Noriko Kawamura, Mamoru Satoh, Atsuyoshi Shimada, Shinji Sasaki, Shinji Hirotsune, Anthony Wynshaw-Boris, and Takao Shimizu. Role of Platelet-Activating Factor Receptor and LIS1 in Neuronal Migration. 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
9. 引地尚子, 石井聡, 進藤英雄, 高戸毅, 清水孝雄. Role of platelet-activating factor in bone metabolism. 第73回日本生化学会, 横浜, 2000年10月11-14日
10. 横溝岳彦, 加藤和彦, 和泉孝志, 清水孝雄. ロイコトリエンB4第二受容体BLT2のクローニングと解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000年12月13-16日
11. 大日方英, 横溝岳彦, 加藤和彦, 清水孝雄, 和泉孝志. ロイコトリエンB4受容体発現におよぼすグルココルチコイドの影響. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000年12月13-16日
12. 花香博美, 和泉孝志, 清水孝雄. EGFPとの融合タンパク質を用いた5-リポキシゲナーゼの細胞内局在と膜移行の解析. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000年12月13-16日
13. 大嶋紀安, 石井聡, 和泉孝志, 清水孝雄. マウス腹腔マクロファージにおける受容体依存的なPAFの分解. 日本脂質生化学研究会, 北海道帯広市, 2001年6月21-22日
14. 徳岡涼美, 石井聡, 島田厚良, 清水孝雄. 血小板活性化因子受容体欠損マウスを用いた神経細胞移動の解析. 第24回日本神経科学, 第44回日本神経化学合同大会, 2001. 9. 26
15. 石井聡, 小笠原英明, 横溝岳彦, 和泉 孝志, 清水 孝雄. マウスシステイニルロイコトリエン2受容体 (CysLT2) の解析. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
16. 大嶋紀安, 石井聡, 和泉孝志, 清水孝雄. マクロファージにおけるPAF受容体依存的なPAF分解. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日

17. 白川純, 岸本幸治, 魚住尚紀, 和泉孝志, 黒柳秀人, 鈴木陽一, 白澤卓二, 中舘和彦, 渡辺恭良, 清水孝雄. 刺激依存性・海馬歯状回特異的新規ホスホリパーゼA₂ (KIDScPLA₂) の酵素学的性質の検討. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
18. 小笠原英明, 和泉孝志, 清水孝雄. マウスCysLT1のクローニングと発現. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
19. 横溝岳彦, 清水孝雄. 二つのロイコトリエンB₄受容体のリガンドと拮抗薬の評価. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
20. 岸本幸治, 白川純, 魚住尚紀, 和泉孝志, 黒柳秀人, 鈴木陽一, 白澤卓二, 中舘和彦, 渡辺恭良, 清水孝雄. 刺激依存性・海馬歯状回特異的新規ホスホリパーゼA₂ (KIDScPLA₂) 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
21. 浅井賢二, 平林哲也, 魚住尚紀, 清水孝雄. 細胞質型ホスホリパーゼA₂ γ の細胞内局在および性状解析. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
22. 平林哲也, 岸本幸治, 小笠原英明, 和泉孝志, 清水孝雄. ロイコトリエンD₄によるミクログリアの活性制御. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
23. 杉本博之, 立井一明, 飯島貴史, 大日方英, 中根慎治, 山下哲, 和泉孝志, M. Bacivic, D. Vance, CTP: phosphocholine cytidyltransferase α (CCT α) 転写のTranscription enhancer factor-4 (TEF-4) による促進とForskolinとDibutyryl cAMPによる抑制. 第74回日本生化学会大会, 京都, 2001年10月25日-10月28日
24. 谷口雅彦. 嗅神経の回路形成過程におけるセマフォリンの分子機能解析. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会, 京都, 2001年9月26日
25. 魚住尚紀, 清水孝雄. 遺伝子改変マウスを用いた細胞質型ホスホリパーゼA_{2a}の機能解析. 第24回. 日本分子生物学会, 横浜, 2001年12月9-12日

26. 谷口雅彦, 長尾伯, 高橋雄二, 山口正洋, 八木健, 森憲作, 清水孝雄. 匂い地図の形成過程におけるセマフォリンの機能解析. 第24回日本分子生物学会, 横浜, 2001年12月9-12日
27. 大日方英, 横溝岳彦, 清水孝雄, 和泉孝志. ロイコトリエンB4受容体-1のグルココルチコイドによる発現上昇. 第75回日本生化学会大会, 京都, 2002年10月14日-10月17日
28. 魚住尚紀, 清水孝雄細胞質型ホスホリパーゼA₂ α のプロスタノイド産生における役割. 第75回日本生化学会大会, 京都, 2002年10月14日-10月17日
29. 北芳博, 魚住尚紀, 清水孝雄. 細胞質型ホスホリパーゼA₂ α の妊娠初期における役割. 第75回日本生化学会大会, 京都, 2002年10月14日-10月17日
30. 岸本幸治, 清水孝雄. 刺激依存性・海馬歯状回特異的新規ホスホリパーゼA₂ (KIDScPLA₂) の神経機能に果たす役割の探索. 第75回日本生化学会大会, 京都, 2002年10月14日-10月17日
31. 石井聡, 清水孝雄. 血小板活性化因子 (PAF) の生体における役割. 第75回日本生化学会大会, 京都, 2002年10月14日-10月17日
32. 谷口雅彦. 匂い地図形成におけるセマフォリンの機能. 平成14年度生理学研究所研究会「シナプス形成とリモデリング-機能発現の分子基盤」, 愛知県岡崎市, 2002年12月6日
33. 谷口雅彦, 清水孝雄, 長尾伯, 高橋雄二, 山口正洋, 森憲作, 八木健. 匂い地図形成におけるセマフォリンの機能. 第25回日本神経科学大会, 東京, 2002年7月9日
34. 立井一明, 山下哲, 和泉孝志. ショウジョウバエ・ホスホリパーゼD遺伝子の強制発現による機能解析. 第75回日本生化学会大会, 京都, 2002
35. 奥野利明, 清水孝雄, 横溝岳彦. Helix 8 of the leukotriene B4 receptor is required for the conformational change to the low-affinity state after G-protein activation. 第76回日

本生化学会, 横浜, 2003年10月18日

36. Yoshiko Iizuka, Takehiko Yokomizo, Akiko Toda, Hiroshi Hagiya and Takao Shimizu. マウスロイコトリエンB4第2受容体の機能解析. 第76回日本生化学会, 横浜, 2003年10月15-18日
37. H. Sugimoto, S. Sugimoto, K. Tatei, H. Obinata, D. Vance, and T. Izumi, Identification of Ets-1 as an Important Transcriptional Activator of CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase a in COS-7 Cells and Co-Activation with Transcriptional Enhancer Factor-4. 第76回日本生化学会大会, 横浜, 2003
38. 戸田晶子, 横溝岳彦, 清水孝雄. 樹状細胞の活性化と遊走におけるロイコトリエンB4の役割. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 福岡: 2003年12月8-10日
39. 野口響子, 石井聡, 清水孝雄. オープン受容体GPR23/p2y9の新規リゾホスファチジン酸受容体としての同定. 第26回日本分子生物学会, 神戸, 2003年12月10-13日
40. H. Sugimoto, K. Okamura, S. Sugimoto, and T. Izumi. Regulation of the transcription for CTP:phosphocholine cytidylyltransferase a: roles of Sp1 as a co-activator with Ets-1, and Net as an important repressor. 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003

(3) 特許出願 合計 2 件 (国際 2, 国内 2)

1. 発明者：清水孝雄, 岸本幸治, 渡辺恭良
発明の名称：カルシウム非依存性である新規ホスホリパーゼA2その遺伝子及びそのプロモーター
特願2001-45938 特開2003-33190
出願人 : 科学技術振興事業団
出願日 : 2000年2月22日 (国内)
2. 発明者：清水孝雄, 石井聡, 野口響子
発明の名称：新規リゾホスファチジン酸受容体

特願2003-7657

出願人　： 科学技術振興事業団

出願日　： 2003年1月18日

(4) 新聞報道、受賞等

清水孝雄　Ernst Schering Award（ドイツ科学賞）2000年

清水孝雄　日本医師会医学賞　2000年

清水孝雄　持田記念学術賞　2001年

清水孝雄　武田医学賞　2003年

横溝岳彦　日本生化学会奨励賞　2001年

(5) その他特記事項

7. 結 び

研究はほぼ期待通りに展開し、また、予想外の多くの発見（新しいcPLA₂の発見、KIDS cPLA₂の発見、第4のLPA受容体の発見など）に興奮し続けた5年間であった。反省点は二つあり、第一はグループでの協力体制にもう少ししっかりした計画性が必要であったこと、また、第二はdual receptor検証を比較的早めに諦めてしまったため、他のグループに先を越されたことである。これらについては、いずれも研究を総括した清水の責任である。5年間の成果を土台にさらに発展が期待できる時期だけに、継続が認められなかったことは大変残念であるが、CREST事業による研究支援のおかげで、これだけの成果を上げることが出来たと考えている。CRESTはあらゆる研究費の中で最も先進的は色々な手法を取り入れ、極めて効率的な研究支援を行ってきたと思われる。具体的には予算措置が十分大型であったこと、人材雇用システムが整備されていること、特許出願に大きな支援を頂いたこと、また、会計などを事務所で行い、研究者サイドの実務が減り、また、透明性が増したこと、さらに、中間評価以外にもほぼ毎年の研究室訪問に十分な討論時間を割いて頂き、実質的なご助言を頂いたことなどである。



2003年12月26日 教室忘年会 同窓生も参加し、大人数となった。